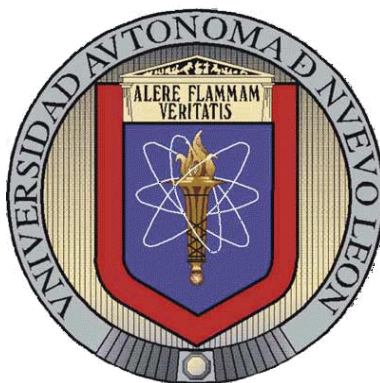


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LÉON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PORTÁTIL BASADO EN MATERIALES ELECTROCATALÍTICOS Y ANTICUERPOS ANTI-S PARA LA DETECCIÓN DEL VIRUS SARS-COV-2

POR:

MC. AZAEL ADRIÁN CAVAZOS JARAMILLO

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN INMUNOBIOLOGÍA

2025

DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PORTÁTIL BASADO
EN MATERIALES ELECTROCATALÍTICOS Y ANTICUERPOS ANTI-S PARA LA
DETECCIÓN DEL VIRUS SARS-COV-2

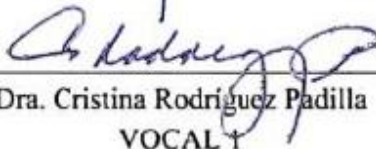
COMITÉ DE TESIS



Dra. Iza Eloisa Luna Cruz
PRESIDENTE



Dr. Juan Manuel Alcocer González
SECRETARIO



Dra. Cristina Rodríguez Padilla
VOCAL 1



Dr. Pablo Zapata Benavides
VOCAL 2



Dr. Ricardo Gómez Flores
VOCAL 3



Dra. Karushka Arévalo Niño
SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



DESARROLLO DE UN BIOSENSOR ELECTROQUÍMICO PORTÁTIL BASADO
EN MATERIALES ELECTROCATALÍTICOS Y ANTICUERPOS ANTI-S PARA LA
DETECCIÓN DEL VIRUS SARS-COV-2

COMITÉ DE TESIS



Dra. Itza Eloisa Luna Cruz
PRESIDENTE



Dr. Juan Manuel Mora Hernández
ASESOR EXTERNO

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

LUGAR DE TRABAJO

El presente proyecto de investigación de tesis fue elaborado en la Unidad de Inmunología Molecular, perteneciente al Laboratorio de Inmunología y Virología, Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.



Este trabajo de investigación se llevó a cabo gracias al apoyo económico y de infraestructura del laboratorio de Inmunología y Virología

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado hacia mi persona para cumplir con la obtención de este grado (CVU:894617).

Quiero agradecer a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por permitirme ser parte del Laboratorio de Inmunología y Virología donde fue posible el llevar a cabo esta investigación, así como por los aportes realizados a este proyecto.

Al Dr. Juan Manuel Alcocer González quien como jefe de nuestro grupo de laboratorio siempre mostró la disposición de apoyar en cualquier dificultad presentada durante el desarrollo de este trabajo, gracias por el tiempo y esfuerzo que ha destinado a fomentar tanto mi desarrollo profesional como personal, siempre valoraré la ocasiones en que pude encontrar en usted un consejo o ayuda.

Agradezco a mi directora de tesis la Dra. Itza Eloisa Luna Cruz quien desde hace algunos años me aceptó como parte del grupo de trabajo y desde ese momento ha sabido brindar su apoyo y confianza en los diversos proyectos en que hemos trabajado, más allá del apoyo en cada paso del posgrado agradezco y valoro la amistad que ha sabido brindar hacia mi persona y espero haber correspondido con las expectativas que pudiera tener sobre mí.

Gracias a mi asesor externo el Dr. Juan Manuel Mora por la disposición a apoyar siempre en los requerimientos de este proyecto, así como la paciencia durante el proceso de aprendizaje que conllevó el desarrollo de esta investigación.

Al Dr. Pablo Zapata y al Dr. Ricardo Gómez por sus valiosas contribuciones, así como la disposición y apoyo presentado para poder realizar este proyecto.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, no enlisto sus nombres como un seguro ante la posibilidad de omitir alguno, gracias por volver ameno el trabajo y por soportarme durante tanto tiempo.

DEDICATORIA

A mi madre María Luisa Jaramillo Luna quien, aunque no pudo ver la conclusión de este trabajo fue un pilar fundamental en mi vida, gracias, mamá por todo lo que te esforzaste para que yo tuviera las mejores oportunidades posibles, hasta donde estés aprovecho para decirte que te quiero de una forma inconmensurable y que hago lo que siempre me dijiste, ser feliz no estando triste... así de fácil nada más.

A mi padre Antonio Cavazos Reyes por enseñarme que no hay atajos para conseguir nuestras metas, que hay que esforzarse y trabajar de forma inteligente, gracias por todo tu esfuerzo y por el ejemplo que has sido para mí.

A mi esposa Mónica Denisse Garza Villegas y a mi hija Rebeca Sofia Cavazos Garza lo más valioso que tengo en la vida, gracias por ser parte de mí y por fungir siempre como la mayor de las motivaciones e inspiraciones, espero seguir ofreciéndoles siempre la mejor versión posible de mí... Las amo.

ÍNDICE

LUGAR DE TRABAJO	I
AGRADECIMIENTOS	III
DEDICATORIA	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XI
RESUMEN	XII
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	2
2.1 Coronavirus	2
2.1.1 Betacoronavirus.....	2
2.2 Coronavirus como emergencia de Salud Pública.....	2
2.2.1 SARS-CoV	3
2.2.2 MERS-CoV	4
2.2.3 SARS-CoV-2.....	5
2.2.3.1 Mecanismo de infección de SARS-CoV-2.....	6
2.3 Electrodo serigrafiado	8
2.4 Biosensores	9
2.5 Clasificación de los biosensores	10
2.5.1 Clasificación de biosensores con base al bioreceptor	10
2.5.1.1 Biosensores enzimáticos	11
2.5.1.2 Biosensores basados en proteína-receptor.....	12
2.5.1.3 Biosensores basados en anticuerpos.....	13

2.5.1.4 Biosensores basados en ácidos nucleicos.....	13
2.5.1.5 Biosensores basados en células completas.....	14
2.5.2 Clasificación de biosensores con base al transductor.....	15
2.5.2.1 Biosensores ópticos	15
2.5.2.2 Biosensores sensibles a masa	16
2.5.2.3 Biosensores electroquímicos	17
2.5.2.4 Biosensores amperométricos.....	17
2.5.2.5 Biosensores potenciométricos	18
2.5.2.6 Biosensores conductimétricos	18
2.5.2.7 Biosensores impedimétricos.....	18
2.6 Materiales electrocatalíticos y biosensores	19
2.6.1 Biosensores electroquímicos basados en materiales electrocatalíticos	19
2.6.1.1 Biosensores electroquímicos basados en oro	19
2.6.1.2 Biosensores electroquímicos basados en platino	20
2.6.1.4 Biosensores electroquímicos basados en carbono.....	20
2.6.1.4.1 Biosensores electroquímicos basados en GQD.....	21
2.7 Biosensores electroquímicas para la detección de SARS-CoV-2.....	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. HIPÓTESIS	25
5. OBJETIVO GENERAL	25
5.1 Objetivos específicos	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
6.1 Diagrama general	26
6.2.1 Nanopartículas de óxido de hierro y nanopartículas de óxido de hierro con cubierta de carbón (Fe ₃ O ₄ @C NPs).....	26

6.2.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)	27
6.2.3 Quantum dots de grafeno (GQDs)	27
6.3 Caracterización de los nanomateriales sintetizados	27
6.4 Análisis de las propiedades electrocatalíticas de los electrodos serigrafiados (SPEs).....	27
6.5 Síntesis de los nanoconjugados (NCs) y construcción de biosensores	28
6.6 Caracterización de inmunosensores electroquímicos portátiles.....	28
6.7 Determinación de la efectividad de los inmunosensores electroquímicos portátiles	28
7. RESULTADOS	29
7.1 Caracterización de los nanomateriales electrocatalíticos.....	29
7.1.1 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$	29
6.1.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)	29
6.1.3 Quantum Dots de Grafeno (GQDs).....	31
7.2 Análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPCE y nanomateriales	32
7.2.1 Electrodo de Carbono Serigrafiado y nanomateriales electrocatalíticos.....	32
7.2.1.1 Análisis del SPCE y AuNPs.....	34
9. CONCLUSIONES	57
10. PERSPECTIVAS.....	58

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Estructura proteica y genómica de SARS-CoV-2 (Gitman et al., 2021).
- Figura 2.** Mecanismo de infección de SARS-CoV-2 (Cevik et al., 2022).
- Figura 3.** Diagrama de un electrodo serigrafiado de carbono (DropSens, 2019).
- Figura 4.** Esquema general de la composición de un biosensor.
- Figura 5.** Esquema de los tipos de biosensor con base en bioreceptores y transductores.
- Figura 6.** Esquema de un biosensor de glucosa construido sobre un SPCE (Hu et al., 2022).
- Figura 7.** Diagrama de la construcción de un biosensor basado en proteína-receptor para la detección de SARS-CoV-2 (Torres et al., 2021).
- Figura 8.** Esquema de un biosensor basada en anticuerpos (Zhang et al., 2019).
- Figura 9.** Esquema de un biosensor basado en ácidos nucleicos (Carvajal-Barbosa et al., 2021).
- Figura 10.** Diagrama de la construcción de un biosensor basado en células completas para la detección de SARS-CoV-2 (Cancino-Bernardi et al., 2022).
- Figura 11.** Diagrama general de la metodología del proyecto.
- Figura 12.** Microscopía electrónica de transmisión de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ NPs.
- Figura 13.** Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de AuNPs.
- Figura 14.** Análisis de la composición química de las AuNPs.
- Figura 15.** Análisis de UV-Vis de las AuNPs en un rango de 450 a 650 nm.
- Figura 16.** Caracterización de los GQDs.
- Figura 17.** Voltamograma cíclico de análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPCE y nanomaterial electroactivo.
- Figura 18.** Voltamograma cíclico de la repetibilidad del biosensor modificado con AuNPs.
- Figura 19.** Microscopía electrónica de barrido del SPCE.

Figura 20. Voltamograma cíclico del conjunto SPCE y AuNPs.

Figura 21. Microscopia electrónica de barrido del SPCE.

Figura 22. Microscopia electrónica de barrido del SPCE con AuNPs.

Figura 23. Microscopia electrónica de barrido del SPCE con AuNPs y anticuerpos anti-S.

Figura 24. Voltamograma cíclico de la caracterización del biosensor.

Figura 25. Voltamograma cíclico del análisis de muestras de suero.

Figura 26. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 1.

Figura 27. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 2.

Figura 28. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 3.

Figura 29. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 4.

Figura 30. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de pacientes.

Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de hisopado nasofaríngeo de pacientes. Muestras 1-4.

Figura 32. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras hisopado nasofaríngeo de pacientes. Muestras 5-8.

Figura 33. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras hisopado nasofaríngeo de pacientes. Muestras 9-10.

Figura 34. Gráfica de I_p de las muestras de hisopados nasofaríngeos de los pacientes analizados.

Figura 35. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de suero pacientes. Muestras 1-2.

Figura 36. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de sueros de pacientes. Muestras 3-5.

Figura 37. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de sueros de pacientes. Muestras 3-5.

Figura 38. Análisis de especificidad del biosensor en muestras de hisopados nasofaríngeos humanos suplementados con proteína S y hemaglutinina de H1N1 respectivamente.

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
μL	microlitro
μA	microamperios
AuNP	Nanopartículas de oro
Fe₃O₄@C	Nanopartículas de óxido de hierro con cubierta de carbono
CV	Voltamperometría cíclica
DPV	Voltamperometría de pulso diferencial
G	gauss
g	gramos
GQD	Quantum dots de grafeno
h	horas
I	corriente resultante
keV	Kilo-electrónvolt
M	molaridad
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitro
mM	milimolar
mVs⁻¹	milivolts por segundo
ng	nanogramos
nm	nanómetros
SPCE	Electrodo de carbono serigrafiado
V	volts

RESUMEN

La incursión de la reciente pandemia provocada por el SARS-CoV-2 ha planteado importantes desafíos para la sociedad, el creciente número de contagios por este patógeno ha puesto en evidencia la necesidad de una detección temprana y efectiva, esto para delimitar estrategias de contención que permitan cortar la cadena de contagio aminorando la diseminación viral. Las pruebas moleculares y serológicas establecidas por las instituciones de salud para la detección del virus han mostrado limitaciones en términos de tiempo de respuesta, infraestructura y sensibilidad. Es por ello que los biosensores electroquímicos se posicionan como una herramienta importante para la detección del SARS-CoV-2. Este trabajo busca desarrollar y evaluar un inmunosensor electroquímico basado en nanopartículas de oro y anticuerpo anti-S para detectar la proteína S del SARS-Cov-2 en muestras de suero humano e hisopados nasofaríngeos. Una vez inmovilizadas las nanopartículas y el elemento bioreceptor en el electrodo de trabajo del SPCE, el dispositivo fue retado contra concentraciones conocidas de la proteína S del SARS-CoV-2 para establecer una curva de calibración mediante voltamperometría de pulso diferencial (DPV). Para la obtención de las curvas de calibración 5 muestras de sueros humanos y 10 hisopados nasofaríngeos fueron suplementados con proteína S del SARS-CoV en una concentración entre 0 y 300 ng/mL. Finalmente, se realizó un ensayo de especificidad retando el biosensor frente a la concentración de proteína H1 del virus de la Influenza A en muestras de hisopados nasofaríngeos.

ABSTRACT

The incursion of the recent pandemic caused by SARS-CoV-2 has posed important challenges for society, the growing number of infections by this pathogen has highlighted the need for early and effective detection of this agent, this to delimit containment strategies that allow the chain of contagion to be cut. The molecular and serological tests established by health institutions for the detection of the virus have shown limitations in terms of response time, infrastructure, and sensitivity. That is why electrochemical biosensors are positioned as an important tool for the detection of SARS-CoV-2. This work seeks to develop and evaluate an electrochemical immunosensor based on gold nanoparticles and Spike protein antibody to detect S protein from SARS-Cov-2 on human serum samples and nasopharyngeal swabs. Once nanoparticle and bioreceptor elements was immobilized on the working electrode of the SPCE, the biosensor was challenged against known concentrations of a SARS-CoV-2 S protein to establish a calibration curve using Differential pulse Voltammetry (DPV) on 5 samples of human serum and 10 nasopharyngeal swab samples spiked with SARS-CoV S protein ranging from 0 to 300 ng/mL. Finally, a specificity assay was performed challenging the biosensor against concentration of H1 protein of Influenza A virus.

1. INTRODUCCIÓN

La pandemia suscitada a causa del virus SARS-Cov-2 ha propiciado cambios importantes en la sociedad actual, dejando a las instituciones de salud a nivel global una complicada tarea para frenar en el menor lapso posible de tiempo las crecientes tasas de infección y mortalidad asociadas a este virus. Hasta el momento la Organización Mundial de la Salud (OMS) y agencias de salud de distintos países como la Food and Drug Administration (FDA) han perfilado como pruebas de detección estándar a la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR), siendo actualmente el estándar de oro para la detección del virus, mientras que pruebas de flujo lateral basadas en anticuerpos se han posicionado como las pruebas rápidas por excelencia en el mercado. Aunque la RT-PCR es un método confiable para la detección del genoma viral, los altos costos instrumentales, la necesidad de personal altamente calificado para su empleo y los extensos tiempos de respuesta necesarios para la obtención de resultados, aunado a la falta de sensibilidad que presentan las pruebas rápidas como los ensayos de flujo lateral, han comenzado a dar lugar para que los organismos internacionales de salud centren su atención en nuevas tecnológicas disruptivas que permitan hacer frente a la creciente demanda de pruebas de detección. Es en este sentido que los biosensores electroquímicos se apuntalan como una importante opción para sustituir las pruebas tradicionales, dado el cada vez mayor número de reportes con respecto a sus cualidades tales como sensibilidad, especificidad y portabilidad, así como la sencillez de su elaboración, los posicionan como herramientas potenciales que permitan hacer frente a los retos actuales del sector salud.

El presente trabajo centra su esfuerzo en el desarrollo de un inmunosensor electroquímico portátil basado en nanomateriales electrocatalíticos que potencien en mayor medida las ya remarcables cualidades sensitivas de los biosensores, lo cual en conjunto con un anticuerpo específico para la proteína S de SARS-CoV-2 y tomando como matrices a electrodos serigrafiados, permitan la construcción de un sistema capaz de detectar de forma eficiente y con pronta respuesta al virus SARS-CoV-2 en diferentes muestras biológicas de pacientes.

2. ANTECEDENTES

2.1 Coronavirus

Compuesto por la familia *Coronaviridae*, subfamilia *Coronavirinae* y al orden de *Nidovirales*, los coronavirus (CoV) consisten en cuatro géneros siendo *Alfacoronavirus*, *Betacoronavirus*, *Gamacoronavirus*, *Deltacoronavirus*. Los miembros pertenecientes a los géneros *Gamacoronavirus* y *Deltacoronavirus* son conocidos por ser capaces de infectar diversas especies de aves, existen reportes con respecto a la infección en mamíferos. Por otro lado, y con mayor importancia medica encontramos a los Alfa y Betacoronavirus conocidos por ser agentes patológicos de mamíferos y principalmente los Betacoronavirus han suscitado en años recientes diversas emergencias de salud pública en diversos países. Los dos alfacoronavirus (hCoV-NL63 y hCoV-229E) y dos betacoronavirus (HCoV-OC43 y HKU1) causan enfermedades parecidos a un resfriado, sin embargo, los otros tres betacoronavirus (SARS-CoV, MERS-CoV y SARS-CoV-2) son clasificados como potencialmente mortales (Jaiswal y Saxena, 2020).

2.1.1 Betacoronavirus

Como parte de la familia *Coronaviridae*, los Betacoronavirus son virus envueltos con un genoma compuesto por RNA monocatenario de polaridad positiva. La composición estructural del virus se basa en cuatro proteínas, la proteína S o espiga es la proteína más externa del virus y por la cual esta familia recibe su nombre debido a la morfología de corona que otorga al virus y sirve como la molécula de reconocimiento ante la entrada a la célula hospedera. La proteína M o matriz es la segunda proteína estructural que poseen los Betacoronavirus, las proteínas de envoltura (E) y nucleocápside (N) constituyen el resto de las proteínas estructurales.

Dado a tener reservorios como murciélagos y roedores este tipo de virus han sido objeto de estudio en años recientes debido a las emergencias de salud pública derivadas de los miembros pertenecientes a esta familia (Cui y Shi, 2019).

2.2 Coronavirus como emergencia de Salud Pública

Las infecciones por coronavirus han amenazado durante los últimos años a nivel mundial. En periodo que comprende del 2002 al 2004, el síndrome respiratorio agudo severo

CoV (SARS-CoV) identificado por primera vez en China causó más de 8,000 infecciones y alrededor de 800 muertes a nivel mundial. En el 2012, el síndrome respiratorio CoV de Oriente Medio (MERS-CoV) identificado en Arabia Saudita se extendió a 27 países, este presentaba una tasa de mortalidad superior al 34.4%. Actualmente en el 2019, la enfermedad por coronavirus causada por el Síndrome Respiratorio Agudo Severo Coronavirus 2 (SARS-CoV-2) nombrada como COVID-19 por la OMS, identificada en la ciudad de Wuhan en China, se clasificó como una pandemia extendiéndose por 216 países, el 25 de octubre de 2020 se reportaron 42,512,186 casos confirmados y 1,147,301 muertes a causa de esta enfermedad (Dai et al., 2020).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró el 30 de enero de 2020 como emergencia de salud pública de importancia internacional (ESPII) el nuevo coronavirus (COVID-19) siendo de alto riesgo principalmente para aquellos países que presentan un sistema de salud vulnerable, sin embargo, el comité de emergencia determinó que la propagación del virus se puede limitar al tener una detección temprana, el aislamiento, un tratamiento acertado, así como el determinar las personas con las que tuvo contacto el paciente.

2.2.1 SARS-CoV

Denominado Síndrome Respiratorio Agudo Severo, es un virus de ARN monocatenario de cadena positiva con un genoma que comprende 29.727 nucleótidos o 30 kb, con un 41% de relación G/C. La estructura genómica del virus comprende el dominio que codifica a la replicasa 5' (rep), que constituye aproximadamente dos tercios del genoma y consta de los genes ORF1a y ORF1b. Los genes ORF1a y ORF1b del dominio rep codifican dos grandes poliproteínas conocidas como pp1a (486 kDa) y pp1ab (790 kDa). Las proteínas estructurales, espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N) son codificadas por cuatro marcos de lectura abiertos (ORF) río debajo de la sección rep. Los productos del dominio rep se traducen a partir de ARN genómico, mientras que las proteínas virales restantes se traducen a partir de ARNm subgenómicos. Además de los genes originales, el genoma del SARS-CoV codifica otras ocho proteínas accesorias aún catalogadas como putativas, conocidas como ORF 3a, 3b, 6, 7a, 7b, 8a, 8b y 9b, que varían en longitud de 39 a 274 aminoácidos. Pese a la homología que presentan tanto dominio rep y las proteínas estructurales de SARS-COV tienen alguna con otros coronavirus, las proteínas accesorias no muestran una homología sustancial con las proteínas

virales de otros coronavirus a nivel de aminoácidos, fungiendo como un factor determinante al momento de discernir entre la identidad de estos virus (Hu et al., 2017).

Como se mencionó previamente SARS-CoV representó una de las emergencias de salud pública más recientes, por lo cual diversos estudios se dieron a la tarea de dilucidar el origen de este virus, en las primeras etapas del brote de SARS, la mayoría de los casos de pacientes nuevos compartían la característica de haber estado expuestos a animales silvestres antes de desarrollar la enfermedad. Posteriormente múltiples investigaciones revelaron que las cepas del SARS-CoV se transmitían a las civetas a través de otros animales. El enigma del origen del virus se reveló con el descubrimiento en murciélagos de cepas virales de coronavirus denominados como similares al SARS debido a poseer los elementos genéticos necesarios para formar el SARS-CoV. En particular, la cepa de murciélago WIV16, es considerada como la más cercana al SARS-CoV, y la cual probablemente se haya producido a través de procesos de recombinación de otras dos cepas prevalentes de SARS-CoV de murciélago. Estos resultados sugieren que los murciélagos pueden ser los reservorios naturales del virus y que las civetas de las palmeras son solo huéspedes intermediarios.

Por lo tanto, la hipótesis que se formó fue que el antepasado directo del SARS-CoV se produjo por recombinación dentro de los murciélagos y luego se transmitió a las civetas u otros mamíferos a través de la transmisión fecal-oral. Cuando las civetas infectadas por el virus se transportaron al mercado de Guangdong, el virus se propagó entre las civetas del mercado y experimentó más mutaciones antes de transmitirse a los humanos. La determinación del reservorio de este virus ayudó de forma importante a contener los casos de infección de este virus eliminando la propagación de este (Cui et al., 2019).

2.2.2 MERS-CoV

El Síndrome Respiratorio de Medio Oriente pertenece a la misma familia, orden y género que el SARS-CoV, aunque es considerado como el primer miembro del linaje C de betacoronavirus por lo cual se le denomina un coronavirus reciente y con un tamaño de genoma que oscila en los 30,119 nucleótidos. El genoma de MERS-CoV codifica 10 proteínas que comprenden dos poliproteínas replicasa (ORF1ab y ORF1a), cuatro proteínas estructurales (E, N, S y M) y cuatro proteínas no estructurales (ORF 3, 4a, 4b y 5). Además de los genes rep y

estructurales, hay genes de proteínas accesorias intercaladas entre los genes de proteínas estructurales que pueden interferir con la respuesta inmune innata del huésped en animales infectados (Du et al., 2016).

A diferencia de los casos de SARS, la mayoría de los casos de MERS tuvieron contacto previo con dromedarios. Las cepas de MERS-CoV aisladas de camellos eran casi idénticas a las aisladas de humanos, y se encontró que las cepas de MERS CoV eran muy prevalentes en camellos de Oriente Medio, África y Asia. El análisis de la secuencia genómica indicó que los coronavirus de murciélago *Tylonycteris* HKU4 y HKU5 están filogenéticamente relacionados con MERS. Generalmente, todos los MERS-CoV relacionados aislados de murciélagos apoyan la hipótesis de que MERS-CoV se originó a partir de murciélagos (Han et al., 2016).

2.2.3 SARS-CoV-2

El agente vírico y patológico más reciente y causante de la actual pandemia es el virus del síndrome respiratorio agudo severo 2. En diciembre de 2019 en Wuhan, China se reportaron múltiples casos de neumonías atípicas generadas por causas desconocidas. Los pacientes compartían el ser personal con visitas registradas al mercado de mariscos Huanan y reportaban cuadros clínicos similares a los presentados por la infección de MERS y SARS-CoV incluyendo cuadros de fiebre, neumonía, tos y dolor de pecho, mientras que en casos más severos se incluía la anosmia y la infiltración pulmonar bilateral. Los casos de pacientes presentando la misma sintomatología comenzaron a expandirse a ritmo acelerado incluyendo a personas sin visitas previas al mercado de mariscos Huanan determinándose la diseminación comunitaria de un nuevo agente patológico. Gracias a diversos análisis metagenómicos del material genético del virus se identificó un nuevo Betacoronavirus publicándose el 9 de enero del 2020 siendo el primer anuncio oficial de este nuevo virus y para el día 30 del mismo mes la WHO determinó como una emergencia de salud pública el brote del nuevo coronavirus. El 11 de febrero de 2020, se denominó por parte del Committee on Taxonomy of Viruses como SARS-CoV-2 al nuevo coronavirus y como COVID-19 a la patología que este propicia. Debido a la rápida diseminación del virus a través de más de 40 países, la WHO decreta al cuadro COVID-19 como una pandemia.

La organización genómica de SARS-CoV-2 se conforma de seis marcos de lectura abiertos (ORF) funcionales compuestos por replicasa (ORF1a/ORF1b), proteína espiga (S), envoltura (E), membrana (M) y nucleocápside (N). Además, siete ORF putativos que codifican proteínas accesorias intercalados entre los genes estructurales. La mayoría de las proteínas codificadas por el SARS-CoV-2 tienen una longitud similar a las proteínas correspondientes del SARS-CoV. De los cuatro genes estructurales, el SARS-CoV-2 comparte más del 90% de identidad de aminoácidos con el SARS CoV a diferencia del gen S, que difiere en 18 aminoácidos con respecto al SARS-Cov2. El gen de la replicasa cubre dos tercios del genoma 5' y codifica una poliproteína grande (pp1ab), que se escinde proteolíticamente en 16 proteínas no estructurales que participan en la transcripción y la replicación del virus (Hu et al., 2020).

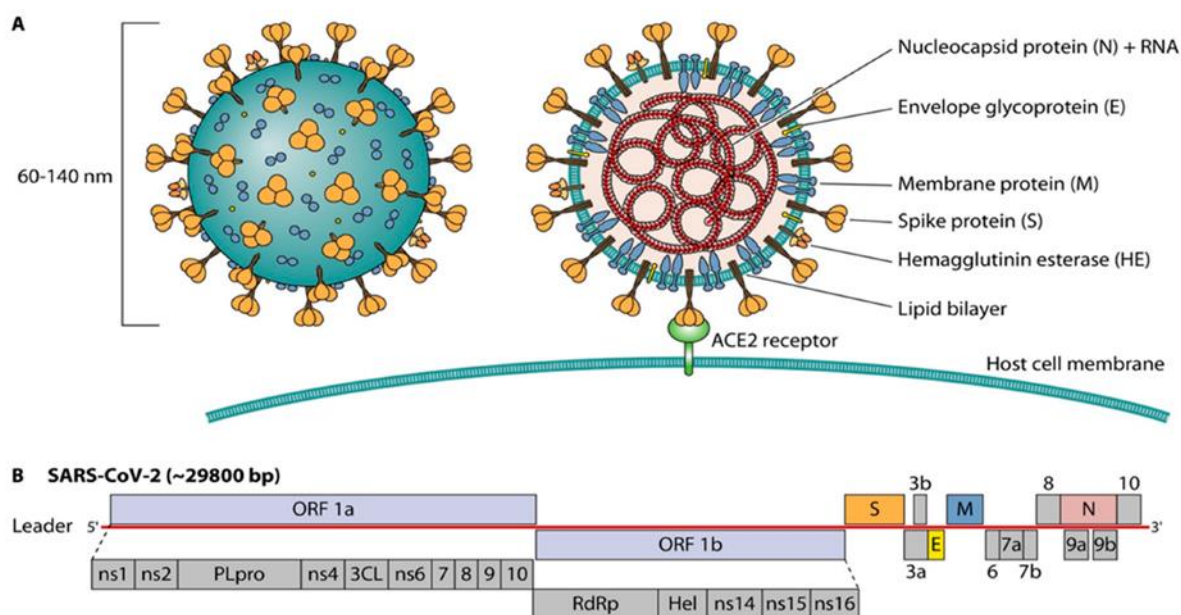


Figura 1. Estructura proteica y genómica de SARS-CoV-2 (Gitman et al., 2021).

2.2.3.1 Mecanismo de infección de SARS-CoV-2

Entre las diversas proteínas estructurales que presenta SARS-CoV-2, la proteína S es la encargada de dar inicio al proceso de infección vírica, esto mediante su interacción con el receptor de la enzima convertidora de angiotensina 2 (ACE2) presente en la célula huésped. ACE2 se expresa principalmente en células alveolares tipo 2 en pulmón, de ahí la particularidad del virus por encontrarse en tracto respiratorio superior (Xu et al., 2020). La proteína S se encuentra conformada por las subunidades S1 y S2. La subunidad S1 es la encargada de mediar

la interacción con ACE2 y se encuentra conformada por el dominio N-terminal (NTD) y por el dominio de unión a receptor (RBD) mientras que la subunidad S2 se encarga de determinar la fusión de membranas y está conformada por los dominios péptido fusión (FP), dominios de repetición heptapeptídicas 1 y 2 (HR1 y HR2), dominio transmembranal (TM) y el dominio C-terminal (CT) (Huang et al., 2020).

La conformación metaestable de la proteína S en estado nativo no permite la interacción con ACE2, es por ello que previo al reconocimiento del receptor es necesario que la proteína S sea procesada mediante clivajes en las subunidades S1 y S2 por proteasas del huésped similares a furinas, lo cual determinará un cambio conformacional permitiendo la interacción entre RBD y ACE2 entre las proteasas del huésped involucradas en el procesamiento de la proteína S se encuentra la serinproteasa TMPRSS2 siendo la única que se encuentra determinada en su totalidad como participante de este fenómeno. El cambio conformacional propiciado por el clivaje mediado por TMPRSS2 permite a su vez que PF de S2 pueda interactuar con la membrana de la célula huésped y que los dominios HR1 y HR2 puedan dimerizarse formando el complejo 6-HB o 6-helix-bundles lo cual afianza la interacción entre membranas y permite la función de estas por endocitosis (Mousavizadeh y Ghasemi, 2020).

Una vez terminado el proceso de ingreso al citoplasma, la nucleocápside vírica se libera y posibilita la entrada del material genómico del virus. Al ser un virus de RNA monocatenario de cadena sencilla con polaridad positiva, actúa como un mRNA el cual se transcribe de manera directa la replicasa viral, por medio de los ORF 1a y ORF 1ab los cuales se traducen en las poliproteínas pp1a y pp1ab. Posteriormente el procesamiento proteolítico de pp1a y pp1ab mediante proteasas codificadas viralmente como 3CLpro, Mpro, proteasas similares a papaína dan lugar a 16 proteínas no estructurales (nsps) denominadas como nsp1-16. Las proteínas no estructurales son las encargadas de conformar el complejo replicasa transcriptasa (RTC), algunas nsps no se encuentran descritas aun con respecto a sus funciones tales son el caso de nsps 6-8 aunque se sospecha se encuentran involucradas la evasión al sistema inmune por parte del virus. El complejo RTC replica y sintetiza un conjunto de RNAs que codifican para la elaboración de las proteínas estructurales S, M, E y N. Debido a la actividad enzimática replicativa el complejo RTC crea una copa de RNA de sentido positivo tomando como molde el RNA polaridad negativa. Una vez sintetizado el RNA de polaridad positiva, este se asocia

con la proteína N para dar lugar a la formación de la nucleocápside. La traducción de todas las proteínas estructurales y accesorias a partir de RNAs subgenómicos es llevada a cabo en el retículo endoplasmático y posteriormente son transportadas al aparato de Golgi donde en conjunto con la nucleocápside, serán ensambladas produciendo nuevas partículas víricas las cuales a su vez serán transportadas en vesículas hacia la membrana plasmática conllevando así la liberación del virus (Pastrian-Soto, 2020).

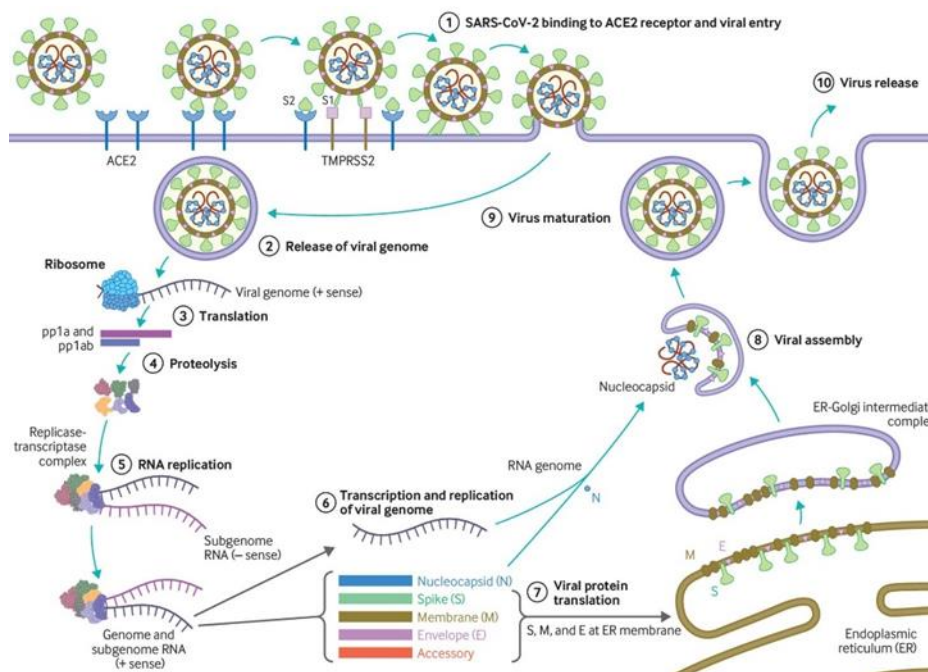


Figura 2. Mecanismo de infección de SARS-CoV-2 (Cevik et al., 2022).

2.3 Electrodo serigrafiados

Los electrodos serigrafiados o SPEs por sus siglas en inglés, matrices desechables elaborados mediante una tecnología de impresión con tintas elaboradas con materiales electrocatalíticos aumentando las cualidades electroquímicas de sistemas electroquímicos sobre sustratos cerámicos o plásticos por lo general. El proceso de elaboración de estas matrices comienza con el uso de una plantilla que fungirá como molde y delimitará el tamaño del electrodo, y a través de la cual se adicionará la tinta que se requiere ya sea grafeno, oro, carbón y platino principalmente. Depositada la tinta y secada mediante radiación ultravioleta, una segunda tinta aísla los sitios conductimétricos del electrodo. La aparición de este tipo de matrices aumentó la posibilidad de realizar análisis electroquímicos para los investigadores,

debido a que los requerimientos de muestras a analizar y de material necesario son bajas por su proceso de miniaturización a micro volúmenes, además de no requerir infraestructura compleja o personal altamente capacitado para su uso, sin perder de vista la portabilidad que estos sistemas otorgan (Kadara et al., 2009; Mohamed, 2016).

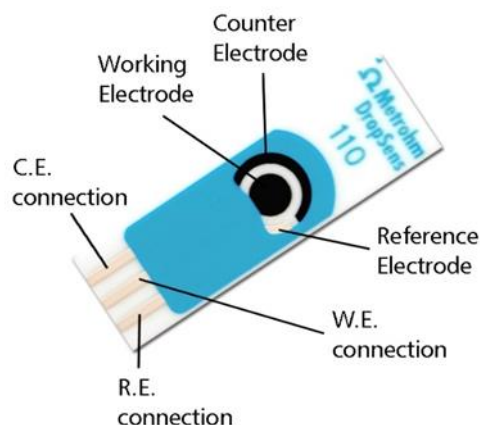


Figura 3. Diagrama de un electrodo serigrafiado de carbono (DropSens, 2019).

2.4 Biosensores

Conformado en su etimología por el termino latín *sensire* cuyo significado se refiere a detectar un elemento y *bios* con significado de vida, el termino de biosensor puede definirse como un dispositivo cuya fase sensora se encuentra compuesta por un elemento biológico. En segunda instancia la International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) otorga una definición más específica de este término, describiéndolo como un dispositivo que, mediante reacciones bioquímicas mediadas por enzimas, inmunosistemas, organelos, tejidos o células puede detectar compuestos químicos a través de señales eléctricas, térmicas, u ópticas generalmente.

Un biosensor se encuentra conformado por dos elementos principales, el receptor y el transductor. Como su nombre lo indica, el elemento receptor es de origen biológico y tiene la función de recibir la señal del medio y dirige esa señal hacia al elemento transductor, el cual permite transducir y convertir dicha señal en datos interpretables y cuantificables. Debido a la versatilidad tanto de los elementos receptores como transductores que la incursión de los biosensores en múltiples campos de investigación ha crecido de manera importante en los últimos años (Ali et al., 2017).

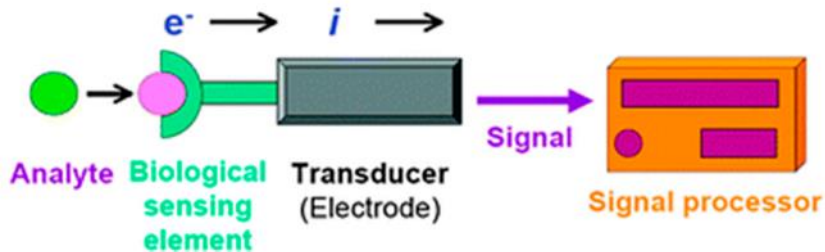


Figura 4. Esquema general de la composición de un biosensor.

2.5 Clasificación de los biosensores

No existe hasta el momento una clasificación homologada por parte de los organismos internacionales pertinentes con respecto a la clasificación de los biosensores, más sin embargo las clasificaciones más aceptadas están basadas en primera instancia en la naturaleza del elemento bioreceptor y en segunda instancia en el tipo de señal que recibe el transductor (Ali et al., 2017).

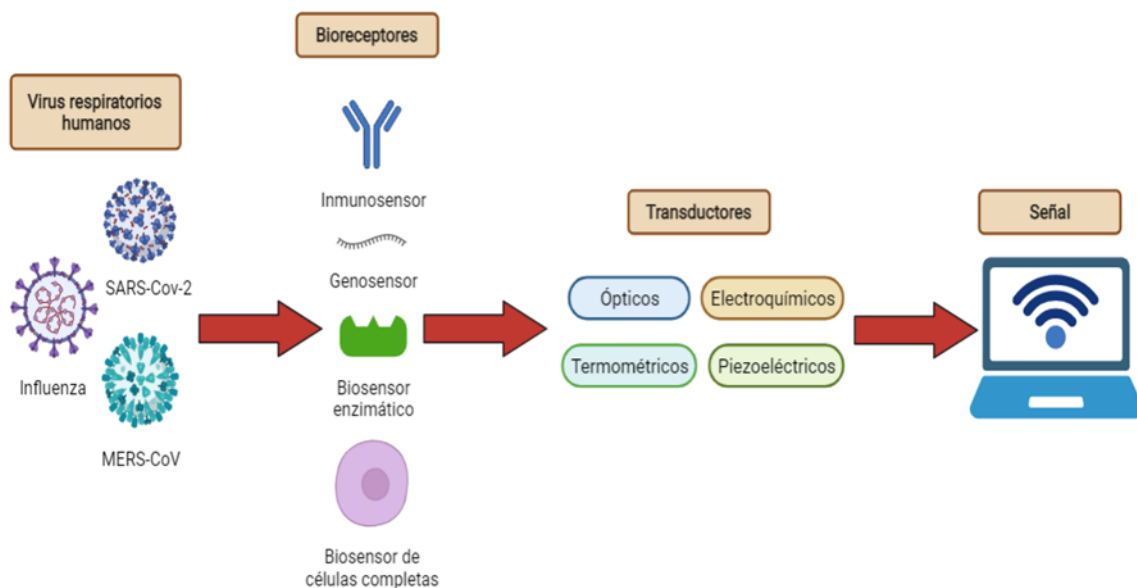


Figura 5. Esquema de los tipos de biosensor con base en bioreceptores y transductores.

2.5.1 Clasificación de biosensores con base al bioreceptor

El enfoque de clasificación con base al elemento bioreceptor de los biosensores se conforma de cinco categorías: enzimáticos, basado en proteína-receptor, inmunosensores, genosensores y basados en células completas (Alhadrami et al., 2018).

2.5.1.1 Biosensores enzimáticos

Este tipo de biosensores basan su funcionamiento en la inmovilización de enzimas que funjan como elemento bioreceptor. Entre las ventajas que presentan este tipo de biosensores encontramos la alta especificidad de las interacciones enzima-sustrato, así como la capacidad de detectar variaciones en diversos fenómenos tales como la concentración de protones (H^+), la liberación o absorción de gases, emisión de luz, absorción o reflectancia o emisión de calor, todos producidos mediante el consumo del sustrato o la formación del producto de una reacción enzimática. El transductor luego convierte esos cambios en señales medibles (señales eléctricas, ópticas o térmicas) que se utilizan para identificar analitos de interés (Nguyen et al., 2019). Entre los ejemplos más ampliamente difundidos con respecto a este tipo de biosensor encontramos al biosensor de glucosa. Las pruebas POC de glucosa fundamentadas en su interacción con glucosa oxidasa representa el mayor participante en el mercado de biosensores desde hace más de cuatro décadas. El desarrollo de este tipo de dispositivos se vio impulsado por tecnologías portátiles tales como los SPCE, siendo capaz de comercializarse con la enzima glucosa oxidasa inmovilizada en su superficie para desarrollar análisis electroquímicos con este tipo de dispositivos.

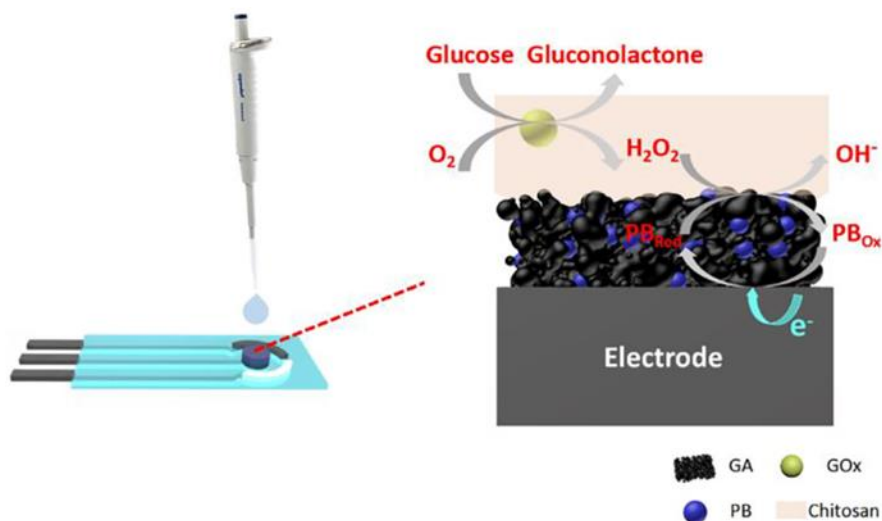


Figura 6. Esquema de un biosensor de glucosa construido sobre un SPCE (Hu et al., 2022).

2.5.1.2 Biosensores basados en proteína-receptor

Esta clasificación se trata de los biosensores que basan su funcionamiento en proteínas no catalíticas y dependen de la capacidad de las proteínas de membrana celular para actuar como receptores. Estos receptores permiten la transducción de la señal de unión a través de la membrana ya sea por receptores metabotrópicos o por receptores ionotrópicos (Alhadrami et al., 2018). Con la irrupción de la pandemia y la determinación de la interacción existente entre la proteína S de SARS-CoV-2 y el receptor ACE2, múltiples trabajos abocaron sus esfuerzos en el desarrollo de biosensores capaces de detectar al virus mediante la interacción de estos dos elementos, Torres y colaboradores en 2021 describieron un sistema basado en electrodos serigrafiados en papel en cuyo electrodo de trabajo fue inmovilizado el receptor ACE2 humano y protegido con una membrana permeable como el nafion, posteriormente tras el reto con diversas concentraciones de la proteína S, los espectros de impedancia aumentaban su señal conforme la proteína S aumentaba, corroborando de esta manera la capacidad del sistema para identificar la interacción proteína-receptor.

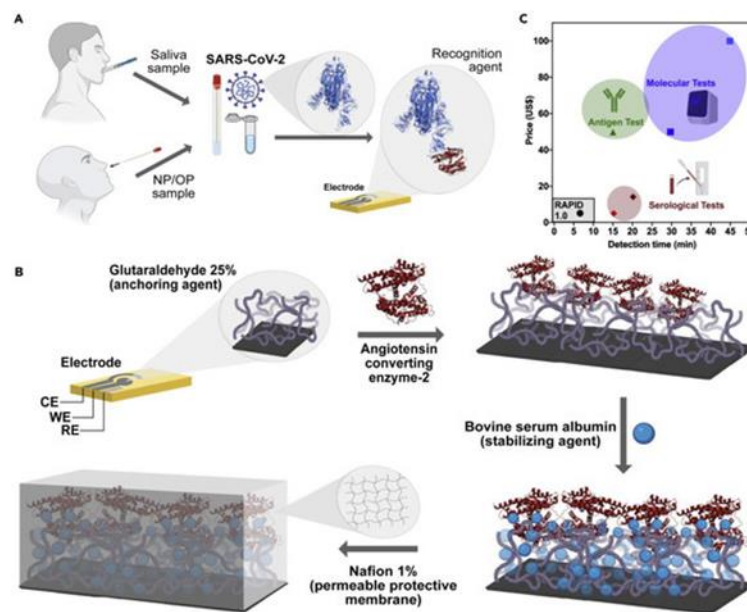


Figura 7. Diagrama de la construcción de un biosensor basado en proteína-receptor para la detección de SARS-CoV-2 (Torres et al., 2021).

2.5.1.3 Biosensores basados en anticuerpos

También conocidos como inmunosensores este tipo de biosensor se encuentra entre los más reportado en la actualidad debido a cualidades como su facilidad de desarrollar y la especificidad del sistema. Estos biosensores basan su principio en la reacción antígeno-anticuerpo, son altamente empleados para detección analitos biológicos de interés médico principalmente. La innovación y disrupción de estos sistemas radica en tener la capacidad de competir contra técnicas convencionales como ELISA y Western Blot, pero elaborada en forma miniaturizada, sin perder sus propiedades sensitivas y específicas. El uso de transductores electroquímicos es empleado para estos sensores debido a ser capaces de registrar la actividad eléctrica propiciada por la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, los inmunosensores se posicionan como el segundo tipo de biosensor portátil más desarrollado en los últimos años y éstos han visto un crecimiento importante debido al desarrollo de matrices novedosas como los electrodos serigrafados (Cho et al., 2018).

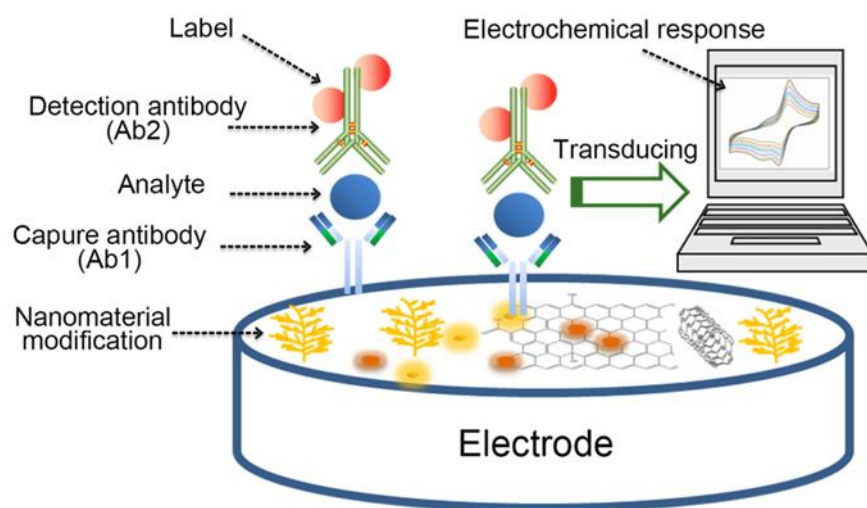


Figura 8. Esquema de un biosensor basada en anticuerpos (Zhang et al., 2019).

2.5.1.4 Biosensores basados en ácidos nucleicos

Este tipo de biosensores conocidos también como genosensores basan su funcionamiento en el uso de aptámeros ya sea de DNA o RNA, estos dispositivos son usados como alternativas al uso de anticuerpos dada su estabilidad, especificidad y bajo costo. Los biosensores basados en aptámeros pueden unirse de forma selectiva a bacterias y virus que sean de interés médico, industrial o de investigación, convirtiendo a este tipo de biosensores en los más versátiles para

detectar organismos. Debido al uso de sondas de ácidos nucleicos estos sistemas pueden modificarse para ser usados de forma sencilla por múltiples tipos de transductores, aumentando la gama de aplicaciones que este tipo de biosensores presentan (Aldrahami et al., 2018).

Los biosensores basados en ácidos nucleicos que hacen uso de aptámeros han sido empleados para la detección de proteínas, fármacos, péptidos y células, los bioreceptores basados en aptámeros de RNA han demostrado una mayor afinidad de unión al metabolito de interés en comparación con los de DNA dirigidos a la misma secuencia diana, debido al grupo funcional 2' hidroxilo en los aptámeros de RNA (Carvajal-Barbosa et al., 2021).

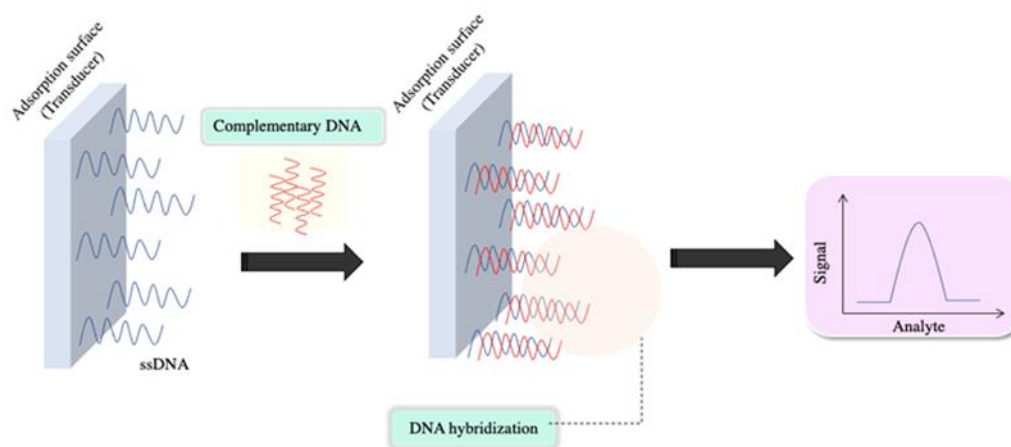


Figura 9. Esquema de un biosensor basado en ácidos nucleicos (Carvajal-Barbosa et al., 2021).

2.5.1.5 Biosensores basados en células completas

Conocidos como citosensores por lo general se basa en técnicas microbiológicas y de ingeniería genética para aprovechar el uso de genes reporteros luminiscentes y se basan en usar células completas inmovilizadas sobre una matriz, para obtener información acerca de la composición química, toxicidad, carcinogenicidad y mutagenicidad de diversos compuestos de una forma rápida y sencilla.

El desarrollo de citosensores permite informar la presencia o ausencia del producto químico bajo investigación, así como medir con su concentración subletal, aunado a brindar información con alta especificidad sobre la fracción biodisponible de los elementos de interés (He et al., 2018). A pesar de ser más complejos de desarrollar en comparación con otros tipos de biosensores, incluso este tipo de sensores ha visto un crecimiento en años recientes, algunos

de los trabajos basados en la detección de SARS-CoV-2 hacen uso de este tipo de biosensores. El trabajo de Cancino-Bernardi y colaboradores en 2022 describen la construcción de un biosensor basado en células completas para la detección de SARS-CoV-2, para lograr la construcción del sistema lograron inmovilizar las células en un electrodo de óxido de estaño en una celda electroquímica tradicional y los análisis fueron realizados mediante la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica, los rangos de detección que guardaron linealidad fueron de 10 a 100 nm para ambas líneas celulares con un límite de detección de 10 y 7.25 pg/mL respectivamente.

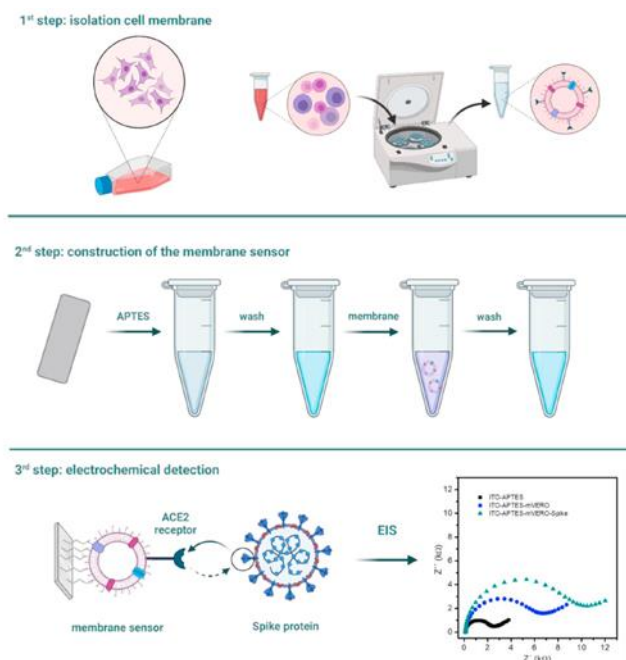


Figura 10. Diagrama de la construcción de un biosensor basado en células completas para la detección de SARS-CoV-2 (Cancino-Bernardi et al., 2022).

2.5.2 Clasificación de biosensores con base al transductor

Este tipo de clasificación de biosensores está compuesto por tres categorías distintas: ópticos, basadas en masa y electroquímicos.

2.5.2.1 Biosensores ópticos

Este tipo de biosensores basan su funcionamiento en el reconocimiento de señales emitidas por la interacción entre el elemento bioreceptor y el analito de interés, siendo la

intensidad de esta señal proporcional a la concentración del analito de interés. Las principales técnicas en las que este tipo de biosensor están basados incluyen la resonancia de plasmón superficial, onda de campo evanescente, espectroscopia de Raman, resonador óptico, cristal fotónico. Entre las ventajas que estos biosensores presentan, encontramos la alta sensibilidad, el bajo ruido con respecto a perturbaciones externas y la estabilidad que presentan. Los biosensores ópticos a su vez se subdividen en dos categorías, la primera tiene como característica estar basada en la interacción directa del receptor con el analito de intereses, en donde el reconocimiento produce alguna señal cuantificable. El segundo tipo de categoría radica en el uso de etiquetas de marcaje en donde al presentarse la interacción entre receptor y analito, dicha etiqueta emite una señal que puede ser colorimétrica, fluorescente o luminiscente (Chen y Wang, 2020).

2.5.2.2 Biosensores sensibles a masa

Estos sensores se utilizan comúnmente para el análisis cinético de la interacción biomolecular. Entre el tipo más común de biosensores sensibles a masa encontramos los referentes a ondas acústicas de superficie (SAW). Los biosensores SAW se han desarrollado en años recientes para detectar varios eventos de reconocimiento biológico, por ejemplo, interacciones proteína-proteína, proteína-ácido nucleico o células-virus. Esta técnica se basa en las propiedades piezoeléctricas de los sensores de cuarzo. Al aplicar un campo eléctrico a los portaobjetos de cristal de cuarzo de corte ST recubiertos de oro, se genera una onda de Love en una capa guía delgada (5 μm) depositada directamente en la superficie del sensor. En consecuencia, los eventos de unión pueden detectarse mediante cambios en las propiedades físicas de la onda de corte de dos formas diferentes: (1) la unión de componentes equivalentes a una masa aumentada conduce a un cambio de fase angular, y (2) las propiedades viscoelásticas de la onda de corte los analitos fueron reflejados por cambios en la amplitud de oscilación y, por lo tanto, dan una idea del modo de unión del analito. A pesar de tratarse de los biosensores más sensibles hasta el momento, también coinciden en ser los más complejos de desarrollar (Hoß y Bendas, 2017).

2.5.2.3 Biosensores electroquímicos

Los biosensores electroquímicos son dispositivos analíticos que transducen eventos bioquímicos como la reacción del sustrato enzimático y la interacción antígeno-anticuerpo a señales eléctricas principalmente a través de impedancia, potencial o corriente eléctrica. El biosensor electroquímico fue desarrollado por Clark y Lyons en 1962 y tenía como objetivo el detectar glucosa en sangre, desde ese primer modelo diversos tipos de biosensor se han introducido y comercializado para diversas aplicaciones. En este tipo de biosensores un electrodo de trabajo electrodo funge como una matriz sólida en donde se para la inmovilización de biomoléculas como elementos receptores y la reacción resultante de interaccionar con su molécula blanca puede ser transducida en señales eléctricas, o bien mediante un sistema indirecto el flujo de electrones puede ser analizado dependiendo de procesos redox en el electrolito empleado (Cho et al., 2020).

Los biosensores electroquímicos conforman la categoría más reportada en la clasificación de transductores, las cualidades como ser sencillos de operar, económicos, sensibles, portátiles y simples de construir han propiciado un aumento sustancial en el número de trabajos con respecto a este tipo de biosensores. Dentro de esta categoría de biosensores podemos encontrar cuatro subcategorías principales conformadas por los biosensores amperométricos, conductimétricos, potenciométricos e impedimétricos (Wu et al., 2019).

2.5.2.4 Biosensores amperométricos

Los biosensores amperométricos se caracterizan por medir el flujo de la corriente entre electrodos del sistema en el momento en que tiene lugar una reacción redox. Los biosensores amperométricos más investigados son aquellos que buscan detectar glucosa, pues su primer reporte se remite a 1962. Los biosensores para glucosa que usan este fundamento, basan su funcionamiento en la inmovilización de glucosa oxidasa (GOx) la cual cataliza la reacción de la glucosa con oxígeno a gluconolactona y peróxido de hidrógeno. La señal generalmente se representa como corriente (amperes) contra la concentración de glucosa causada por una reacción redox de un mediador o peróxido de hidrógeno en el electrodo de trabajo (Sadeghi, 2013).

2.5.2.5 Biosensores potenciométricos

En este tipo de biosensores el elemento bioreceptor se encuentra inmovilizado sobre un electrodo de trabajo y se compara el potencial electroquímico contra un electrodo de referencia. Una vez que el bioreceptor está unido al electrodo de trabajo el analito puede interactuar con este, por lo tanto, es capaz de cambiar el potencial electroquímico, o bien el potencial puede modificarse por la liberación de productos derivados de la interacción entre bioreceptor y analito (Ding y Quin, 2020).

2.5.2.6 Biosensores conductimétricos

Como su nombre lo indica este tipo de biosensores basa su funcionamiento en la detección de cambios en la conductividad eléctrica. La formación de estos biosensores se realiza mediante la conexión de un electrodo de "fuente" y uno de "drenaje" con una matriz en donde se encuentre inmovilizado el bioreceptor y a continuación, se mide la conductividad o resistividad frente a la concentración de analito. En años recientes técnicas como la del transistor de efecto de campo (FET) se ha convertido en herramientas importantes de ayuda para el desarrollo de este tipo de biosensores, demostrando amplias capacidades de ser empleados para la detección de patógenos de interés, demostrando una amplia sensibilidad rondando la escala de fentogramos y siendo altamente específicos cuando se combinan con el uso de anticuerpos monoclonales (Bai y Trau, 2011).

2.5.2.7 Biosensores impedimétricos

Los biosensores impedimétricos miden los cambios en la conductancia de carga y la capacitancia en la superficie del sensor a medida que se produce la unión selectiva del bioreceptor con el analito de interés. Esta subcategoría de biosensor también ha acrecentado el número de reportes en años recientes tras la miniaturización de sistemas electroquímicos de detección, y ha sido de especial ayuda para los sistemas basados en anticuerpos en conjunto con la técnica de espectroscopia de impedancia electroquímica (EIS). La técnica de EIS combina el análisis de las propiedades resistivas y capacitivas de los materiales, basándose en la perturbación de un sistema en equilibrio por una señal de excitación sinusoidal de pequeña amplitud. EIS ha potenciado el uso de biosensores impedimétricos al demostrar su aplicabilidad

para el desarrollo de biosensores basados en enzimas, anticuerpos, ácidos nucleicos, células y microorganismos (Guan et al., 2004; Kim et al., 2019).

2.6 Materiales electrocatalíticos y biosensores

Un material electrocatalítico puede definirse como un catalizador involucrado en reacciones electroquímicas y que funciona sobre la superficie de los electrodos o que funge como la propia superficie del electrodo. Un material electrocatalítico puede funcionar de manera heterogénea, como nanopartículas de platino u oro, o de forma homogénea, como un complejo de coordinación o enzima. El material electrocatalítico tiene como función ayudar en la transferencia de electrones entre el electrodo y los reactivos en el medio, así como facilitar una transformación química intermedia descrita por una semirreacción general. Los materiales electrocatalíticos modifican y aumentan la velocidad de las reacciones electroquímicas mediante la interacción con los reactivos para alterar las vías de reacción y disminuir la barrera de activación, y que no se consumen en el proceso de reacción. En el caso de reacciones electroquímicas, la velocidad de reacción depende de factores como la temperatura, la presión, medio de solución, el estado de la superficie sólida, entre otros factores, aunados a ser dependientes del campo eléctrico que cruza la interfaz electrodo/solución, que está involucrada en una reacción electroquímica. Además, la velocidad de reacción también depende de la estructura de la doble capa del electrodo. Por lo tanto, la velocidad de reacción electroquímica se puede controlar modificando los electrocatalizadores en la superficie del electrodo. Los metales de transición como Fe, Rh, Pd, Ir, Pt, Au, Sn, Cu y sus aleaciones se utilizan como electrocatalizadores eficientes y se emplean ampliamente en la industria química moderna, la industria petroquímica y la purificación de gases de escape de automóviles. y pilas de combustible y son los materiales en conjuntos con los derivados del carbono quienes han potenciado el uso de los biosensores electroquímicos en particular (Wei et al., 2018).

2.6.1 Biosensores electroquímicos basados en materiales electrocatalíticos

2.6.1.1 Biosensores electroquímicos basados en oro

Siendo catalogado como uno de los nanomateriales más populares, el uso de oro en nanoestructuras principalmente como nanopartícula (AuNP) han sido reconocidas como

candidatas con amplios potenciales para el desarrollo de biosensores electroquímicos debido a su mayor relación superficie/volumen y las propiedades dominadas por la interfaz. En años recientes múltiples trabajos han sido desarrollado con base al uso de estructuras áuricas demostrando una aplicación importante de la señal a detectar y con rangos eficientes de detección obtenidos a través de las buenas propiedades electrocatalíticas de los AuNP.

Entre los trabajos más recientes reportados con el fundamento del uso AuNP para su uso en biosensores tenemos el reporte de Medetalibeyoglu y colaboradores en 2020, basado en la funcionalización de AuNP con aminotiofenol y óxido de grafeno como nanocomposito y construido sobre un electrodo de vidrio. Este nanocomposito fue usado como una plataforma de inmunosensor mediante el uso de un anticuerpo anti-PSA1, un antígeno prostático de interés médico, el límite de detección obtenido por este sistema novedoso ronda el rango de 0.01 pg/mL a 3 fg/mL siendo hasta el momento una de las construcciones con mayor sensibilidad reportada.

2.6.1.2 Biosensores electroquímicos basados en platino

Como uno de los materiales electrocatalíticos por excelencia para la formación de hidrogeno a partir de diversas fuentes, así como por las ventajas que presentan en termino de conductividad eléctrica y una amplia área electroactiva, el platino ha sido uno de los materiales más estudiados para el desarrollo de biosensores electroquímicos entre los trabajos recientes y más novedosos se encuentra el de Liu y colaboradores en 2020, en donde el cambio de enfoque hacia el uso de estructuras nanobipiramidales de oro y recubiertas por platino y polidopamina los cuales se usan como etiquetas de marcaje para anticuerpos anti-APOE4 obteniendo rangos lineales de 0.05 ng-2000 ng/mL y un límite de detección de 15.4 pg/mL (Liu et al., 2020).

2.6.1.4 Biosensores electroquímicos basados en carbono

Los materiales derivados de carbono como los quantum dots de grafeno (GQD) y los quantum dot de carbono (CQD) han sido usados como materiales electrocatalizadores debido a propiedades como conductividad electrónica favorable, gran área de superficie y facilidad de manipulación, así como biocompatibilidad además de fungir como soportes para dispersar y estabilizar metales, óxidos metálicos y nanomateriales semiconductores, que amplían las propiedades sinérgicas electrocatalíticas y optoelectrónicas (Liu et al., 2018).

2.6.1.4.1 Biosensores electroquímicos basados en GQD

Los GQD pueden definirse como láminas de grafeno de menos de 100 nm, con una amplia área superficial y múltiples sitios activos de superficie, así como bordes más accesibles en comparación con el grafeno. Debido al confinamiento cuántico y el efecto de borde, los GQD tienen transporte de electrones de alta velocidad y excelente conductividad, lo que los convierte en un material transductor relevante para mejorar o controlar la transferencia de electrones heterogéneos para el diseño de biosensores además de sus propiedades ópticas. Las propiedades electroquímicas y ópticas de los GQD dependen de la forma, la altura y los estados de los bordes de los GQD (Campuzano et al., 2019).

Los análisis más recientes en el uso de GQD se llevan a cabo usándolo como modificadores de superficies en electrodos de oro como reportó Yang y colaboradores en 2017, mediante el desarrollo de un inmunosensor para la detección del antígeno carcinoembrionario mediante el uso de GQD en conjunto con nitrógeno en conjunto con platino, paladio y oro nombrando el conjunto Au (PtPd/N-GQDs@Au) logrando obtener un rango lineal de detección en concentraciones de 5 fg/mL a 50 ng/mL con un límite de detección de 2 fg/mL en muestras de suero humano.

2.7 Biosensores electroquímicas para la detección de SARS-CoV-2

Tras la declaración de pandemia por parte de la OMS como resultado de la aparición de SARS-CoV-2, múltiples pruebas fueron aprobadas por las instituciones gubernamentales en materia de salud, estableciendo la RT-PCR como estándar de oro para la detección del virus y dando su anuencia para el uso de pruebas rápidas basadas en serología como alternativa a las técnicas moleculares. Sin embargo, ha sido evidente en los últimos meses como los requerimientos que la pandemia ha propiciado han superado las capacidades de las técnicas tradicionales para afrontar el reto de la detección del virus, es por ello que desde la aparición de este agente patógeno múltiples grupos de investigación se han abocado a la tarea de desarrollar biosensores electroquímicos como alternativa a los métodos de detección actuales obteniendo buenos resultados hasta el momento.

Entre los trabajos más representativos encontramos al producto eCovSens desarrollado por Mahari y colaboradores, el cual se encuentra basado en la inmovilización del anticuerpo monoclonal nCovid-19 sobre nanopartículas de oro y su inmovilización sobre un electrodo de óxido de estaño dopado con flúor (FTO) obteniendo un límite de detección de 90 fM de proteína S en muestras de saliva y tiempos oscilantes de respuesta entre 10-30 segundos. Un segundo trabajo reportado es el de Seo y colaboradores reportando la detección de SARS-CoV-2 mediante el uso de la técnica de transistor de efecto de campo (FET), el biosensor está basado en la inmovilización de un anticuerpo monoclonal anti-S de SARS-CoV-2 sobre láminas de grafeno, siendo capaces de detectar a virus en muestras de hisopados nasofaríngeos desde una concentración de 2.42×10^2 copias/mL y de 1.6×10^1 pfu/mL en medio de cultivo en un tiempo promedio de 3 minutos. Fabiani y colaboradores reportan el desarrollo de un biosensor electroquímico para proteína S o N de SARS-CoV-2 mediante el uso de nanopartículas magnéticas y anticuerpos en conjunto con un anticuerpo marcado con fosfatasa alcalina fungiendo como un elemento extra para la especificidad del sistema, los nanoconjugados fueron depositados sobre un electrodo serigrafiado de carbono obteniendo límites de detección de 19 ng/mL y 9 ng/mL en saliva para las proteínas N y S respectivamente. Este sistema demostró la capacidad de concentrar muestras del virus en saliva debido a la propiedad magnéticas de las nanopartículas de óxido de hierro empleadas, así como poder fungir tanto como un biosensor electroquímico, como óptico.

Por último, el reporte más robusto de un biosensor electroquímico para SARS-CoV-2 pertenece a Zhao y colaboradores quienes desarrollaron un sistema basado en calixareno funcionalizado con óxido de grafeno para la detección del RNA del virus. El sistema se compone de dos componentes previos a la adición de las muestras denominados como pre-mezclas 1 y 2. La pre-mezcla 1 se compone de nanopartículas de óxido de hierro dopadas con oro y sobre las cuales se inmovilizan sondas de capturas para el RNA del virus, mientras que la premezcla 2 se compone por láminas de óxido de grafeno con calixareno inmovilizado, así como azul de toluidina, una sonda auxiliar y una sonda de marcaje. La pre-mezcla A captura el material genómico del virus y la pre-mezcla B es capaz de formar concatámeros con la premezcla A para aumentar las señales electroquímicas cuando se encuentra el RNA viral atrapado por las sondas de captura. Cada elemento se encuentra inmovilizado sobre un electrodo serigrafiado de carbono que tiene la capacidad de ser analizado mediante el uso de un smartphone mediante el uso de un

potenciostato portátil. El sistema es capaz de detectar un mínimo de 200 copias del virus por mililitro una cantidad muy inferior a las 5,000 que requieren los métodos tradicionales.

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a los retos que la actual pandemia suscitada por SARS-CoV-2 ha impuesto a las instituciones de salud a nivel global, la necesidad de desarrollar pruebas de detección vírica que cumplan con cualidades de sensibilidad, especificidad, portabilidad y tiempos cortos de respuesta se vuelve imperante ante las limitaciones que las pruebas en el mercado presentan. Es por ello que los biosensores electroquímicos se apuntalan como una herramienta importante que pueda posicionarse en el nicho de necesidad actual, los reportes presentados por diversos grupos de trabajo confirman el potencial aplicativo de las tecnologías electroquímicas como una solución viable para hacer frente al reto de detectar al SARS-CoV-2 en pacientes de forma rápida, confiable y sin la necesidad de destinar grandes presupuestos para el desarrollo de instalaciones complejas o personal altamente entrenado para su uso.

4. HIPÓTESIS

La conjugación de nanomateriales electrocatalíticos con anticuerpos anti-S de SARS-CoV-2 y su inmovilización sobre un electrodo serigrafiado permitirá la detección electroquímica de la proteína S del virus SARS-CoV-2 en muestras de fluidos biológicos.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un biosensor electroquímico portátil basado en nanomateriales electrocatalíticos conjugados con anticuerpos anti-S de SARS-CoV-2 capaz de detectar la proteína S del virus en muestras de fluidos biológicos.

5.1 Objetivos específicos

1. Sintetizar y caracterizar nanopartículas de carbono, óxido de hierro, oro y quantum dots de grafeno.
2. Analizar las propiedades electrocatalíticas del conjunto electrodo serigrafiado/nanopartículas.
3. Sintetizar y caracterizar nanoconjugados nanopartícula/anticuerpos anti-S del virus SARS-CoV-2.
4. Determinar la capacidad del sistema para la detección de la proteína S del virus SARS-CoV-2 en muestras de fluidos biológicos.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Diagrama general

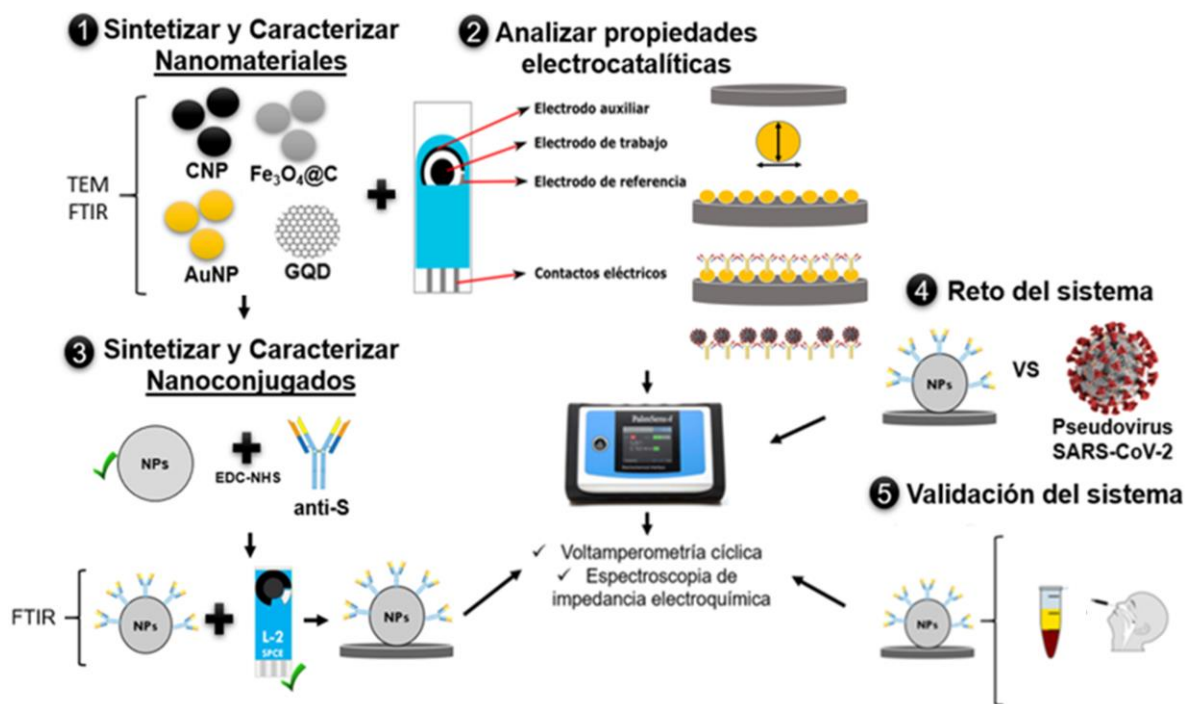


Figura 11. Diagrama general de la metodología del proyecto.

6.2 Síntesis de nanomateriales

6.2.1 Nanopartículas de óxido de hierro y nanopartículas de óxido de hierro con cubierta de carbono (Fe₃O₄@C NPs)

Las nanopartículas de Fe₃O₄ se obtuvieron mediante el método de coprecipitación. En primera instancia se disolvieron 202.6 mg de sulfato de hierro (II) heptahidratado (FeSO₄·7H₂O) y 546.1 mg de cloruro de hierro (III) hexahidratado (FeCl₃·6H₂O) en 50 mL de ddH₂O, se agregaron 15 mL de hidróxido de amonio (NH₄OH) (Productos Químicos Monterrey) por goteo a una velocidad de 100 µL por minuto y se incubaron a 60 °C durante 2 h en agitación magnética, todo el proceso se llevó a cabo con un flujo continuo de argón. Al terminar la incubación se realizaron al menos 10 ciclos de lavados con ddH₂O, etanol y acetona empleando un campo magnético externo para concentrar las nanopartículas y estas se dejaron secar 12 h a 25 °C. Para la formación de la cubierta de carbono, los núcleos magnéticos se sometieron a un proceso hidrotermal a 180 °C adicionando 300 mg de curcumina en una autoclave termal (Techinstro).

6.2.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

Se calentaron 20 mL de ácido cloroáurico (HAuCl_4 , 1 mM) (Sigma-Aldrich) bajo agitación magnética a 200 °C por 10 min. Se añadieron 2 mL de citrato de sodio al 1% y se incubaron bajo agitación hasta obtener una coloración rojiza.

6.2.3 Quantum dots de grafeno (GQDs)

Los GQD se obtuvieron mediante pirolisis de ácido cítrico, en donde 2 g de ácido cítrico (Sigma-Aldrich) se sometieron a licuefacción a 200 °C hasta obtener una solución naranja brillante. Posteriormente, se agregaron 30 mL de hidróxido de sodio a 1 mg/mL (NaOH) a razón de 1 ml por minuto.

6.3 Caracterización de los nanomateriales sintetizados

Los nanomateriales previamente obtenidos fueron caracterizados mediante microscopía electrónica de transmisión (TEM), se utilizará el programa IMAGE J para el análisis de las imágenes. Las imágenes de microscopía electrónica de barrido se llevaron a cabo mediante el microscopio JEOL modelo JEM 6390-LV. El espectro de absorbancia mediante espectroscopía de absorción UV/Vis se realizó en un rango de 450 a 600 nm (Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX multimode microplate reader).

6.4 Análisis de las propiedades electrocatalíticas de los electrodos serigrafiados (SPEs)

Se evaluaron las cualidades electrocatalíticas del conjunto nanomaterial y electrodo serigrafiado de carbono (SPCE) (Ref: C110) (Metrohm) depositando 10 μL de los nanomateriales sobre la superficie del electrodo de trabajo de cada SPCE, siendo inmovilizados mediante adsorción electrostática y se incubaron durante 24 h a 25 °C, se midieron mediante voltamperometría cíclica (CV) utilizando un potencial entre -0.4 V y 0.9 V, a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} , utilizando PBS 1X, pH 7.4 (Thermo Fisher Scientific) como electrolito en un potenciostato (910 PSTAT mini Metrohm).

6.5 Síntesis de los nanoconjugados (NCs) y construcción de biosensores

Tras caracterizar la morfología, composición y las cualidades electrocatalíticas de los nanomateriales sintetizados, se emplearon anticuerpos anti-S de SARS-CoV-2 (Genescript) para formar los nanoconjugados nanopartículas-anticuerpos. Las nanopartículas inmovilizadas en el electrodo de trabajo del SPCE fueron puestas en contacto con 20 μL de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, 50 mM) y 60 μL de *N*-hidroxisuccinimida (NHS, 100 mM) (Sigma-Aldrich) durante 24 h a 25 °C, posterior a la incubación se agregaron 2 μL del anticuerpo a una concentración de 10 μM . Como agente de bloqueo se emplearon 2 μL de albúmina sérica bovina (BSA, 1%) (Sigma-Aldrich) durante 1 h a 4 °C.

6.6 Caracterización de inmunosensores electroquímicos portátiles

Se realizó la caracterización electroquímica de cada biosensor durante y posterior a su construcción (SPE sin modificar, SPE modificado con el nanomaterial, anticuerpo, NC, BSA y antígeno) mediante las técnicas electroquímicas CV utilizando un potencial con 5 ciclos entre -0.4 V y 0.6 V, a una velocidad de barrido de 50 mVs^{-1} , para la evaluación final del biosensor se empleó voltamperometría de pulso diferencial (DPV) en un rango de potencial de -0.7 a 0.7 V, a una velocidad de barrido de 0.05 mV/s .

6.7 Determinación de la efectividad de los inmunosensores electroquímicos portátiles

Se retó a cada biosensor por separado incubando 10 μL de concentraciones conocidas de suero e hisopados nasofaríngeos en un rango de 0 ng a 300 ng/mL, incubándose durante 20 min a 25 °C. El análisis electroquímico se realizó mediante las condiciones previamente descritas.

6.7 Análisis de especificidad

Para determinar la especificidad del sistema se incubaron 10 μL de hisopados nasofaríngeos suplementado con proteína S y proteína H1 del virus influenza respectivamente en un rango de concentración entre 0 a 300 ng/mL, los biosensores fueron incubados durante 20 minutos a 25 °C y posteriormente evaluados bajo las condiciones mencionadas previamente.

7. RESULTADOS

7.1 Síntesis y caracterización de los nanomateriales electrocatalíticos

7.1.1 Nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$

Se sintetizaron tres diferentes nanomateriales electrocatalíticos, el primero fue $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$. En la figura 12a y 12b podemos observar los núcleos de Fe_3O_4 obtenidos, presentando una morfología de cristal con un tamaño alrededor de 10 nm. Tras obtener los núcleos magnéticos estos se recubrieron con carbono a partir de curcumina obtenido nanopartículas de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ con un tamaño alrededor de 15 nm y una morfología cuasiesférica observándolos en la figura 12c y 12d.

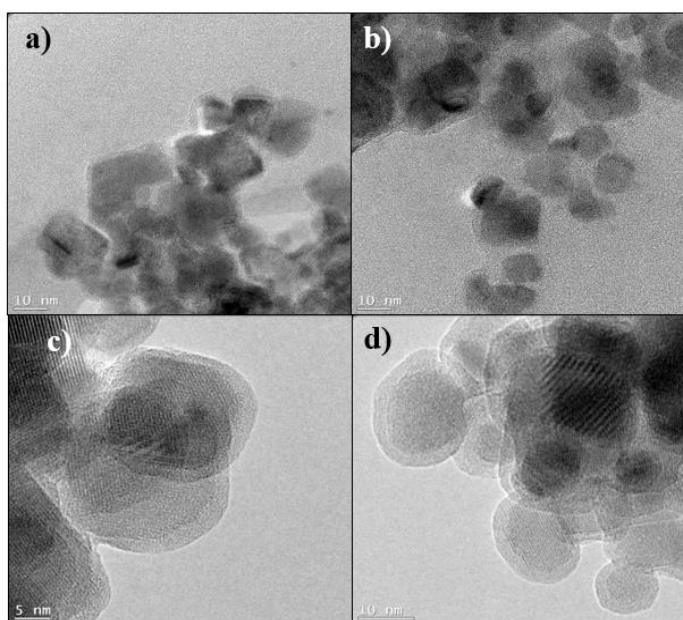


Figura 12. Microscopía electrónica de transmisión de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ NPs. a-b) Muestra de núcleos de Fe_3O_4 . **c-d)** Muestra de $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ NPs. Barra de escala= 5 nm y 10 nm.

6.1.2 Nanopartículas de oro (AuNPs)

La figura 13 corresponde a caracterización de las AuNPs, el segundo nanomaterial electrocatalítico sintetizado, en la figura 13a podemos observar nanopartículas con una morfología cuasiesférica y un tamaño alrededor de 35-40 nm. En la figura 13b-f y en la figura 14 podemos observar el análisis de la composición química de las AuNPs sintetizadas, logrando observar en mayor proporción la presencia de oro en la muestra de dichas nanopartículas.

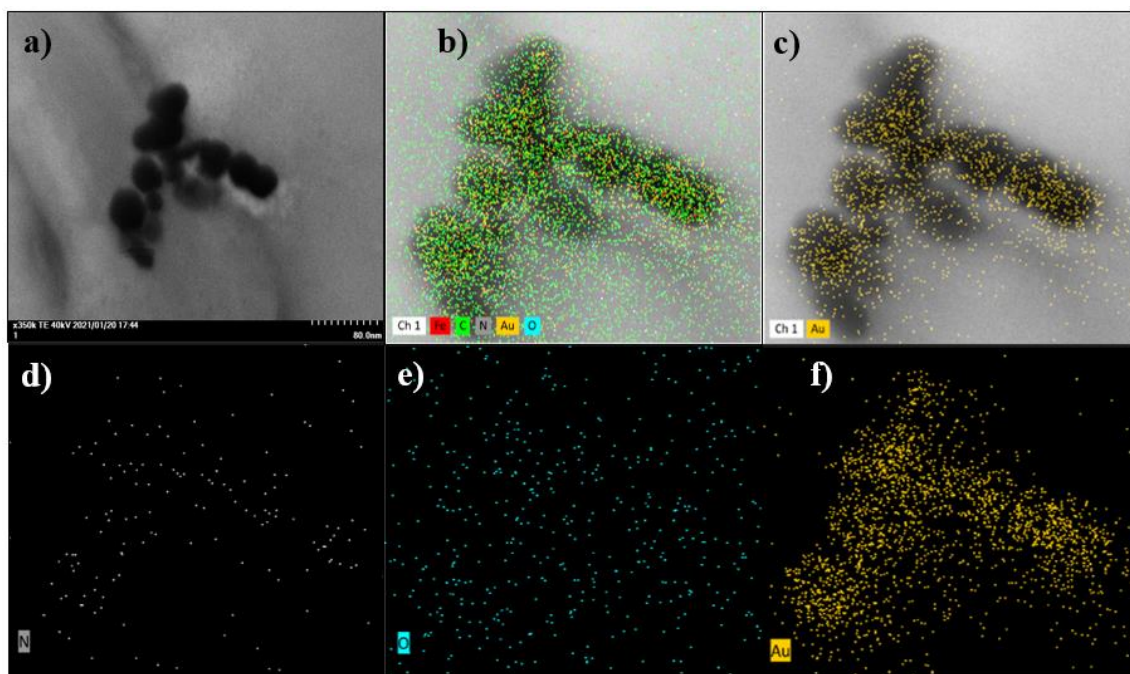


Figura 13. Microscopía electrónica de transmisión de alta resolución (HRTEM) de AuNPs. a) Muestra de AuNPs. **b)-f)** Análisis de la composición química de las AuNPs.

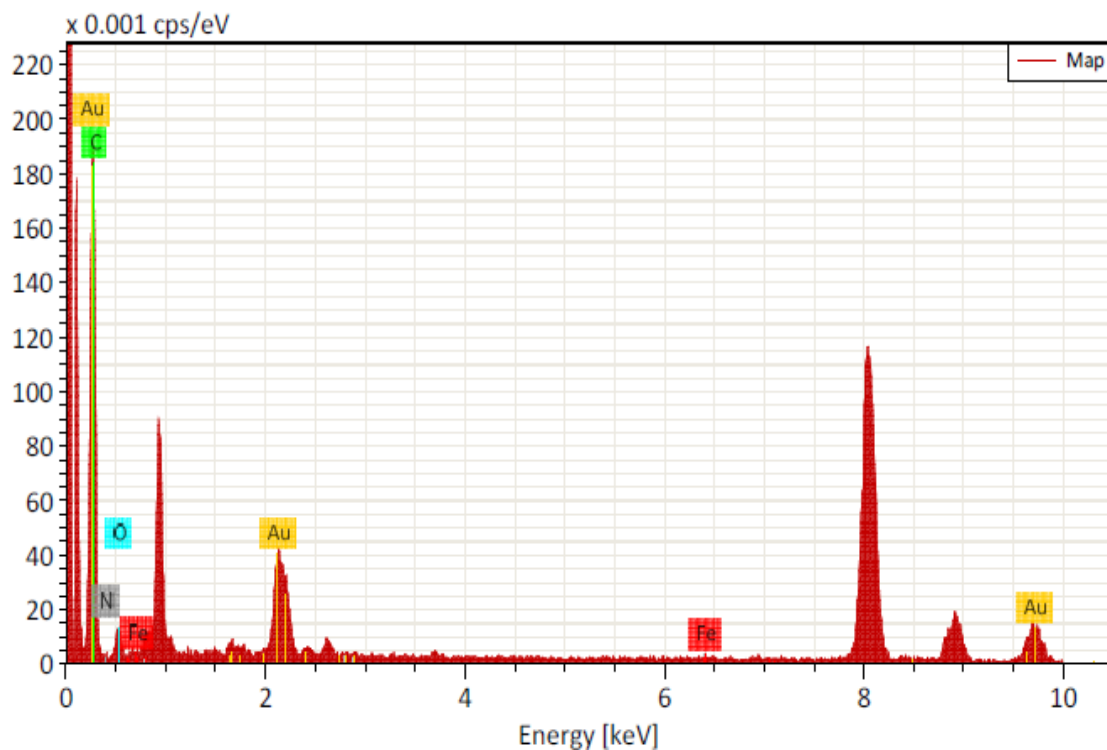


Figura 14. Análisis de la composición química de las AuNPs.

Se realizó un análisis UV-Vis de las AuNPs obtenidas para corroborar la presencia de oro en la muestra, observando en la figura 15 un pico a 521 nm.

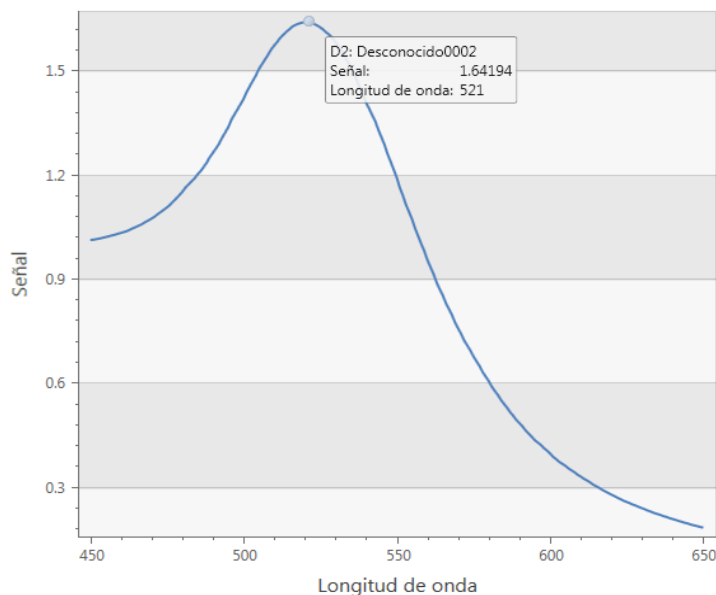


Figura 15. Análisis de UV-Vis de las AuNPs en un rango de 450 a 650 nm.

6.1.3 Quantum Dots de Grafeno (GQDs)

El tercer nanomaterial electrocatalítico sintetizado fueron los GQDs, observando en la figura 16 la caracterización de este mediante luz visible y TEM, presentando una tonalidad de fluorescencia color cian correspondiente a un tamaño alrededor de 7-10 nm, correspondiente con los observado en la microscopía obtenida.

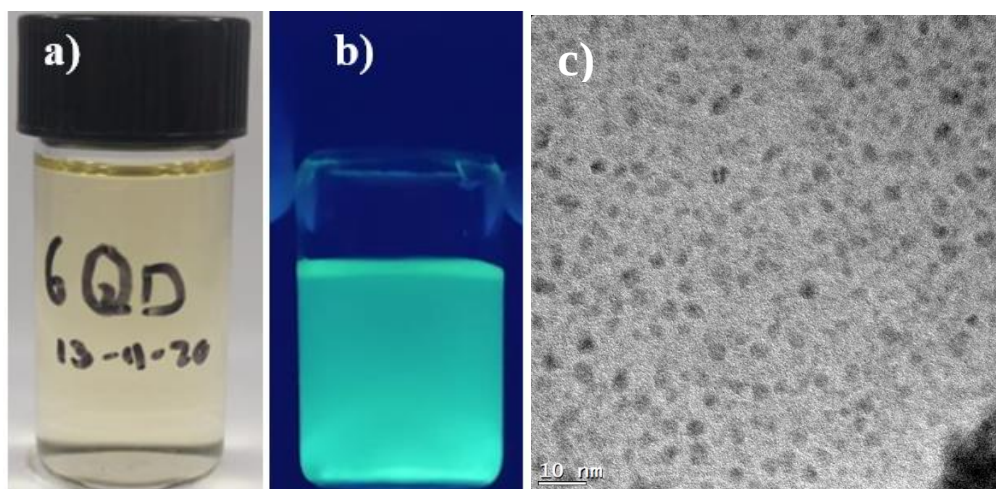


Figura 16. Caracterización de los GQDs. a) Muestra de GQDs en luz visible. b) Determinación de la fluorescencia de los GQDs mediante luz UV. c) Microscopía electrónica transmisión de los GQDs. Barra de escala= 10 μm .

7.2 Análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPCE y nanomateriales

7.2.1 Electrodo de Carbono Serigrafiado y nanomateriales electrocatalíticos

En la figura 17 podemos observar el análisis del conjunto SPCE y los tres distintos nanomateriales electrocatalíticos mediante voltamperometría cíclica, utilizando PBS como electrolito, observando que el SPCE sin modificar presentó una corriente resultante (I) anódica de 0.89 μA , al modificarlo con Fe_3O_4 la I anódica fue de 0.39 μA , por otro lado, al modificar la superficie del WE del SPCE con GQDs aumentó a 2.36 μA , sin embargo, al inmovilizar AuNPs en el electrodo la I anódica obtenida fue mayor que la presentada por los GQDs aumentando a 5.97 μA .

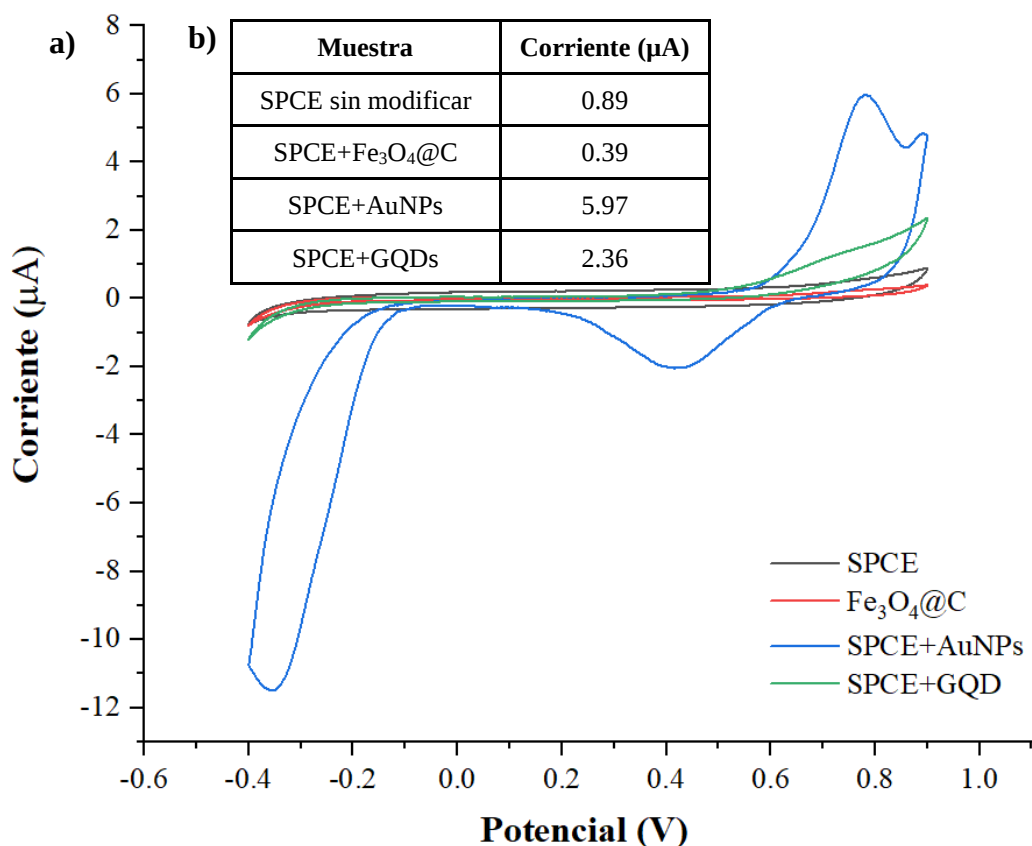


Figura 17. a) Voltamograma cíclico de análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto SPCE y nanomaterial electroactivo. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con: $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{C}$ (rojo), AuNPs (azul), GQDs (verde). Potencial con ciclos entre -0.4 y 0.9 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito PBS 1X (pH 7.4). **b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.**

La figura 18 muestra la repetibilidad del SPCE con nanopartículas inmovilizadas sobre su superficie, sin observarse señales inespecíficas o cambios en la corriente asociada a la deposición del material.

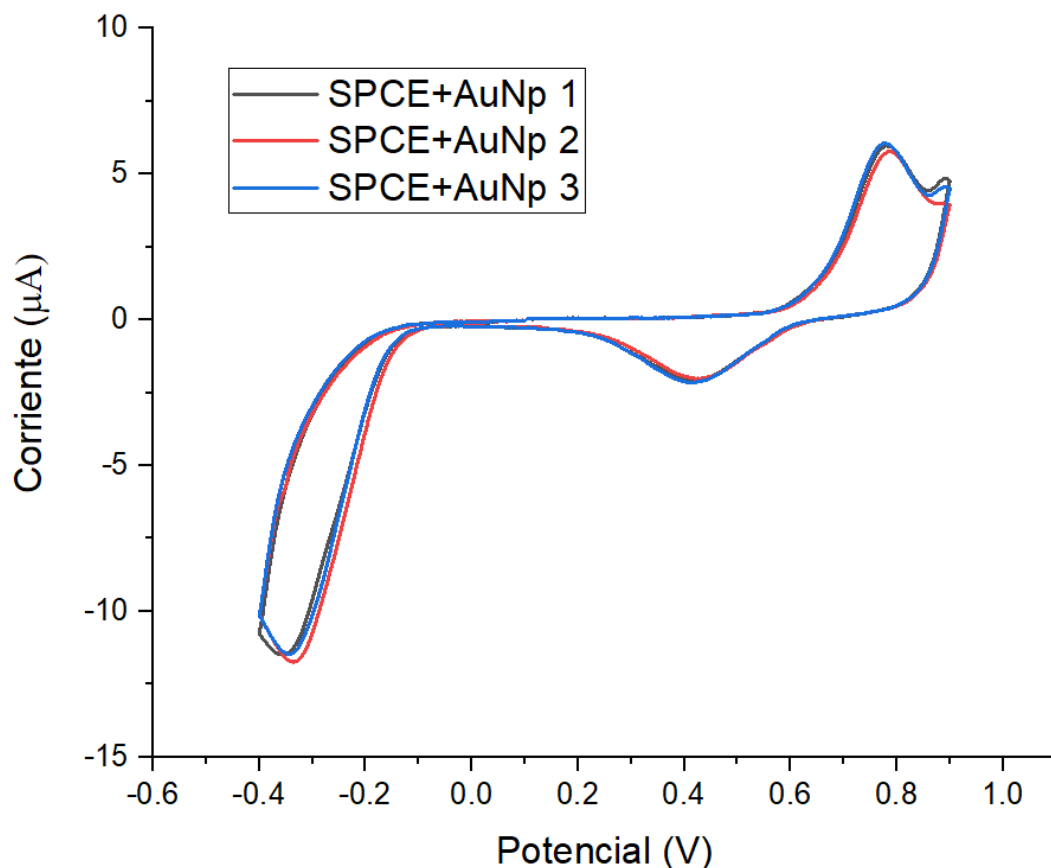


Figura 18. Voltamograma cíclico de la repetibilidad del biosensor modificado con AuNPs. Repetición 1 (negro). Repetición 2 (rojo). Repetición 3 (azul). Potencial con ciclos entre -0.4 y 0.9 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 10 mVs^{-1} , con el electrolito PBS 1X pH 7.4.

La figura 19 corresponde a la caracterización del SPCE mediante microscopía electrónica de barrido, observando en la figura 19a el SPCE sin modificar logrando distinguir las hojuelas de carbono y en la figura 19b se puede observar las AuNPs inmovilizadas sobre la superficie del SPCE recubriendo el carbono del electrodo.

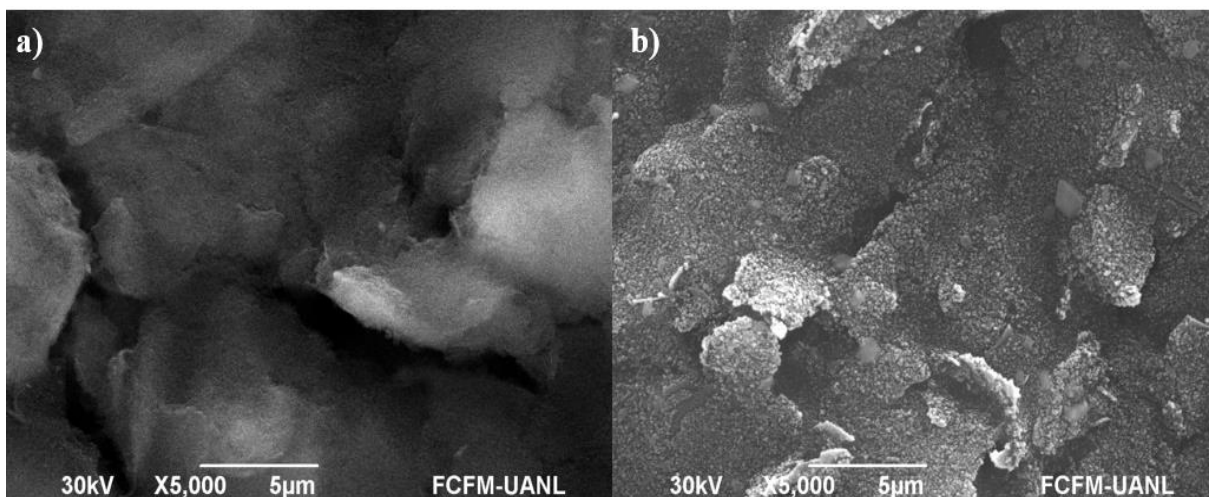


Figura 19. Microscopía electrónica de barrido del SPCE. a) SPCE sin modificar. b) SPCE modificado con AuNPs. Barra de escala= 5 μ m.

7.2.1.1 Análisis del SPCE y AuNPs

Tras determinar que el nanomaterial que presentó un mayor aumento en la I anódica tras modificar el SPCE fueron las AuNPs, se realizó un análisis mediante voltamperometría cíclica utilizando el $K_4Fe(CN)_6$ permitiendo observar procesos de oxidación y reducción, observando en la figura 20 un aumento de la I anódica del SPCE sin modificar de 92.27 a 120.63 μ A modificándolo con las AuNPs.

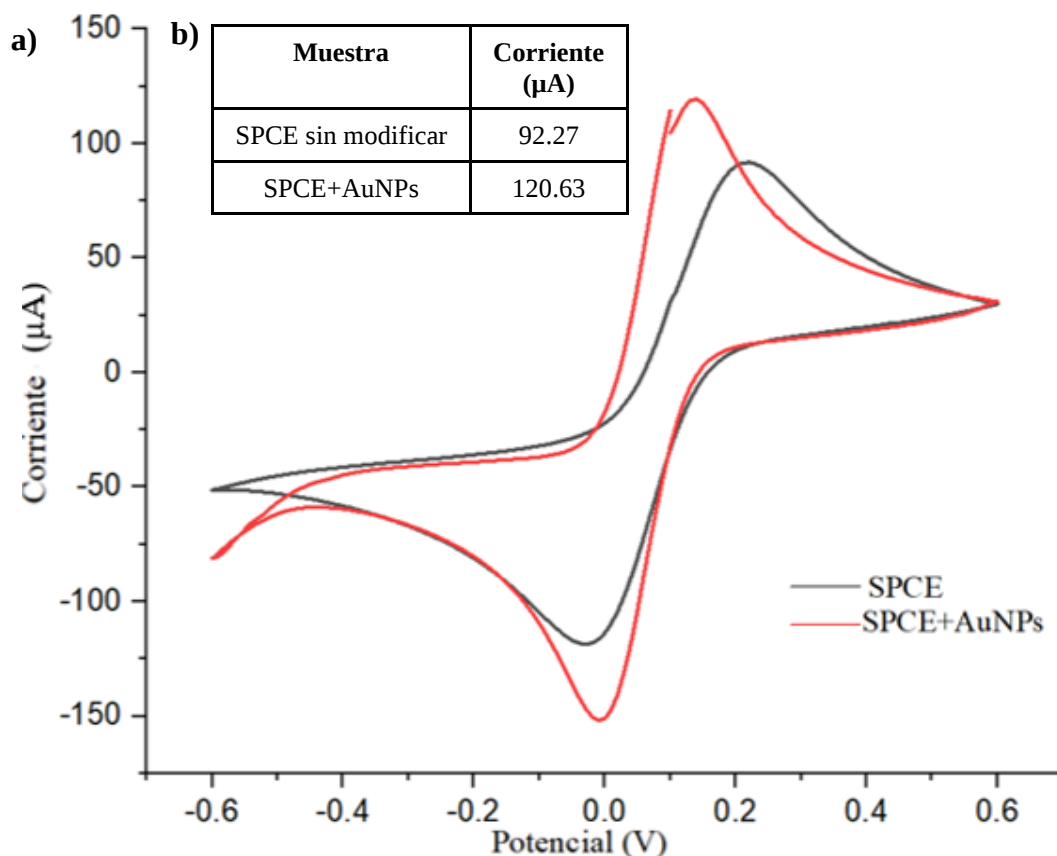


Figura 20. a) Voltamograma cíclico del conjunto SPCE y AuNPs. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con AuNPs (rojo). Potencial con ciclos entre -0.6 y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM y KCl 100 mM). **b) Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.**

7.3 Síntesis y caracterización de los nanoconjugados nanopartícula/anticuerpos anti-S de SARS-CoV-2

La evaluación de la correcta elaboración de los nanoconjugados fue corroborada por SEM acoplada a espectroscopia de rayos X de energía dispersiva (EDS), la figura 21 muestra el EDS correspondiente al SPCE sin modificar. La figura 22 representa el EDS del SPCE con las nanopartículas de oro inmovilizadas en su superficie. Por su parte la figura 23 muestra el EDS del SPCE con complejos de AuNPs conjugadas con anticuerpos anti-S de SARS-CoV-2 inmovilizadas en su superficie.

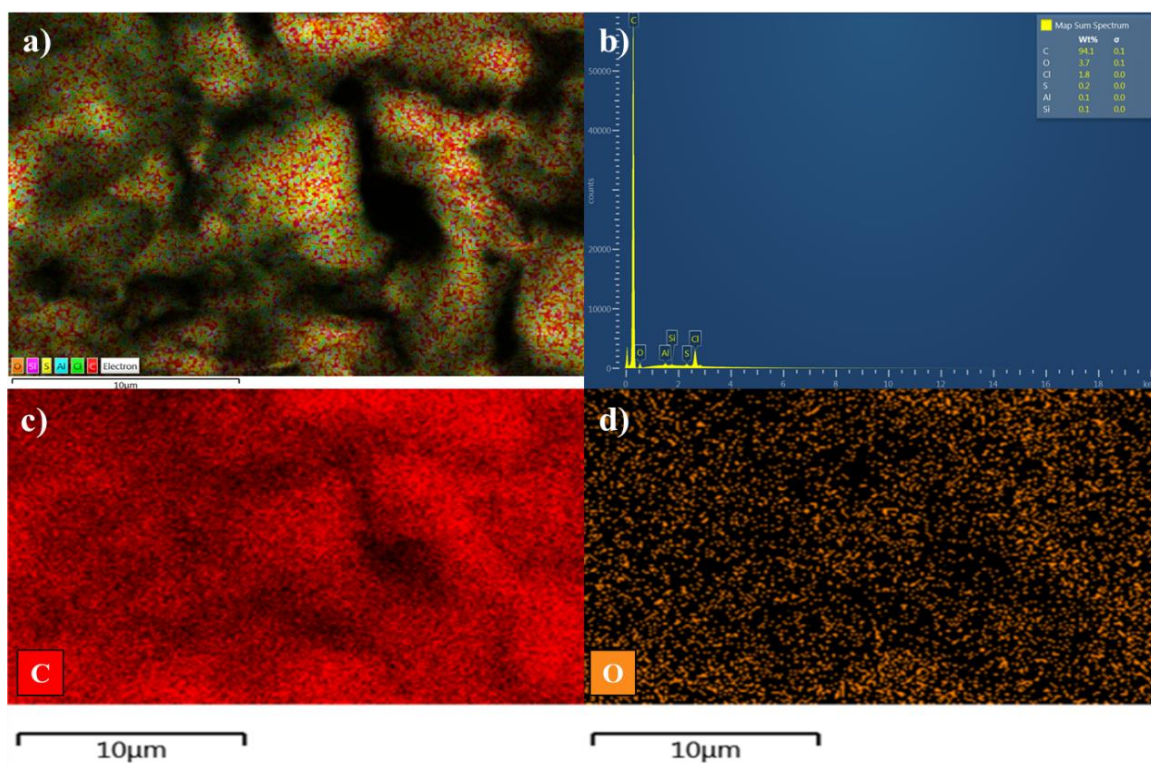


Figura 21. Microscopia electrónica de barrido del SPCE. a) Espectro EDS completo de SPCE sin modificar, **b-d)** Análisis químico del SPCE sin modificar.

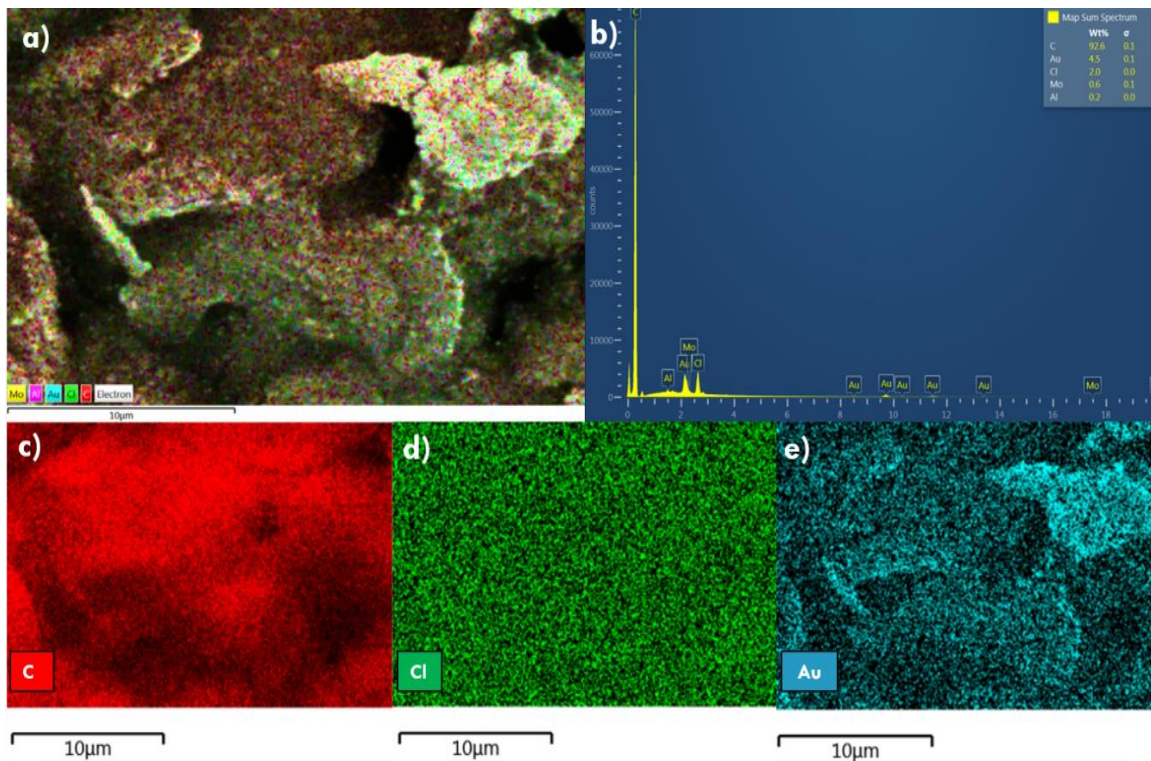


Figura 22. Microscopia electrónica de barrido del SPCE con AuNPs. a) Espectro EDS completo de SPCE con AuNPs inmovilizadas. **b-e)** Análisis químico del SPCE con AuNPs inmovilizadas.

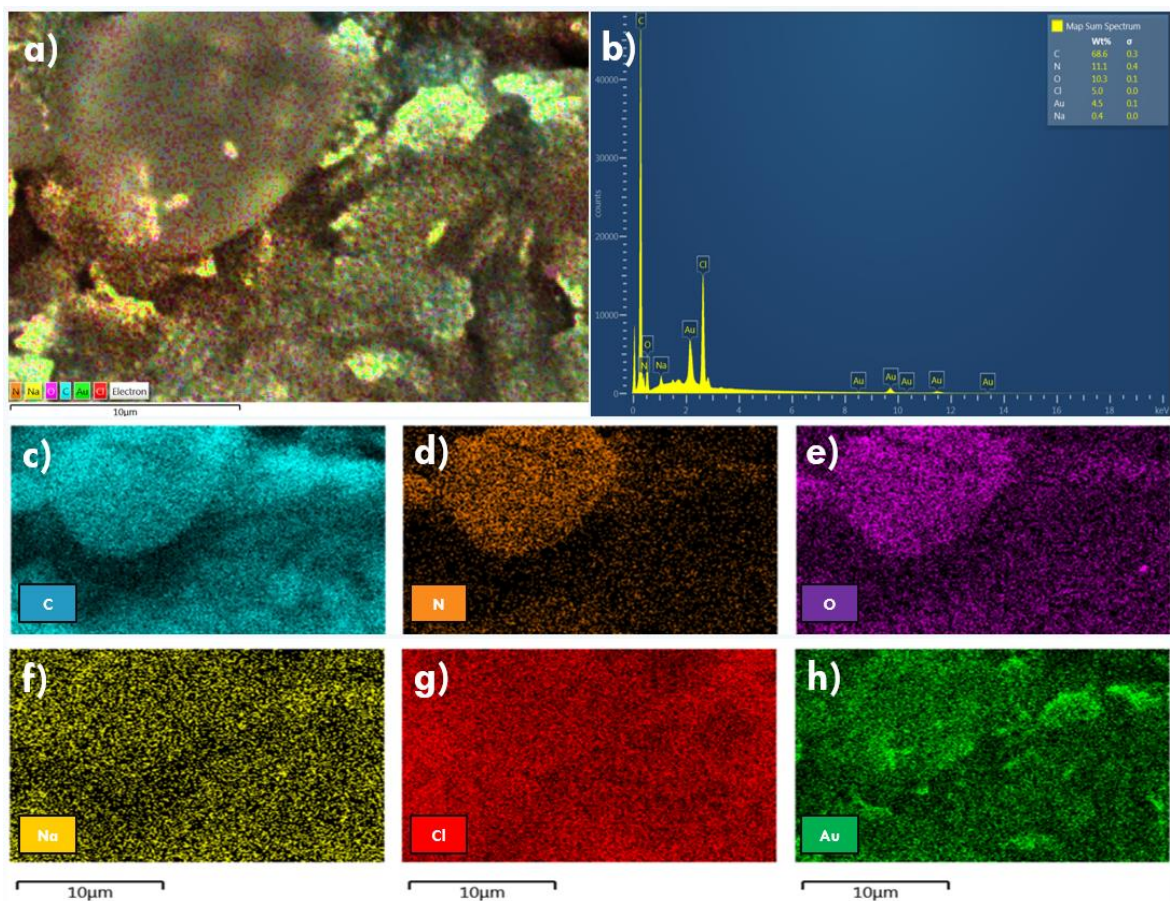


Figura 23. Microscopia electrónica de barrido del SPCE con AuNPs y anticuerpos anti-S. a) Espectro EDS completo de SPCE con AuNPs y anticuerpos inmovilizados. **b-h)** Análisis químico del SPCE con AuNPs y anticuerpos conjugados.

Para determinar la correcta inmovilización de los elementos del biosensor, se realizó una caracterización electroquímica de la construcción del dispositivo mediante CV como se muestra en la figura 24 demostrando la baja en la corriente esperada tras la inmovilización de los elementos.

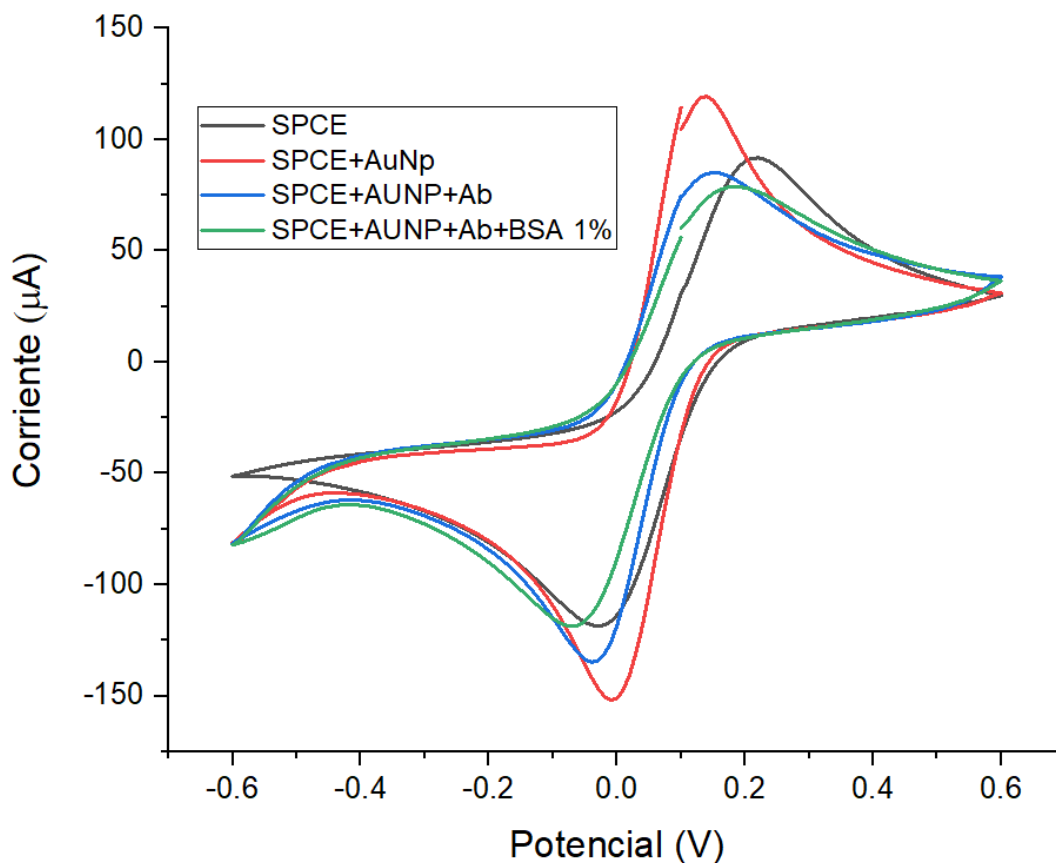


Figura 24. Voltamograma cíclico de la caracterización del biosensor. SPCE sin modificar (negro). SPCE modificado con AuNPs (rojo). SPCE modificado con AuNPs y anticuerpo (azul). SPCE modificado con AuNPs, anticuerpo y BSA (verde). Potencial con ciclos entre -0.6 y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10 mM).

7.5 Determinación de la capacidad del biosensor para la detección de SARS-CoV-2

La figura 25 demuestra la estabilidad y repetibilidad del biosensor al interactuar con muestras de suero humano, en el voltamograma se aprecia la ausencia de señales inespecíficas en el medio, así como una alta homogeneidad entre las cuatro muestras analizadas.

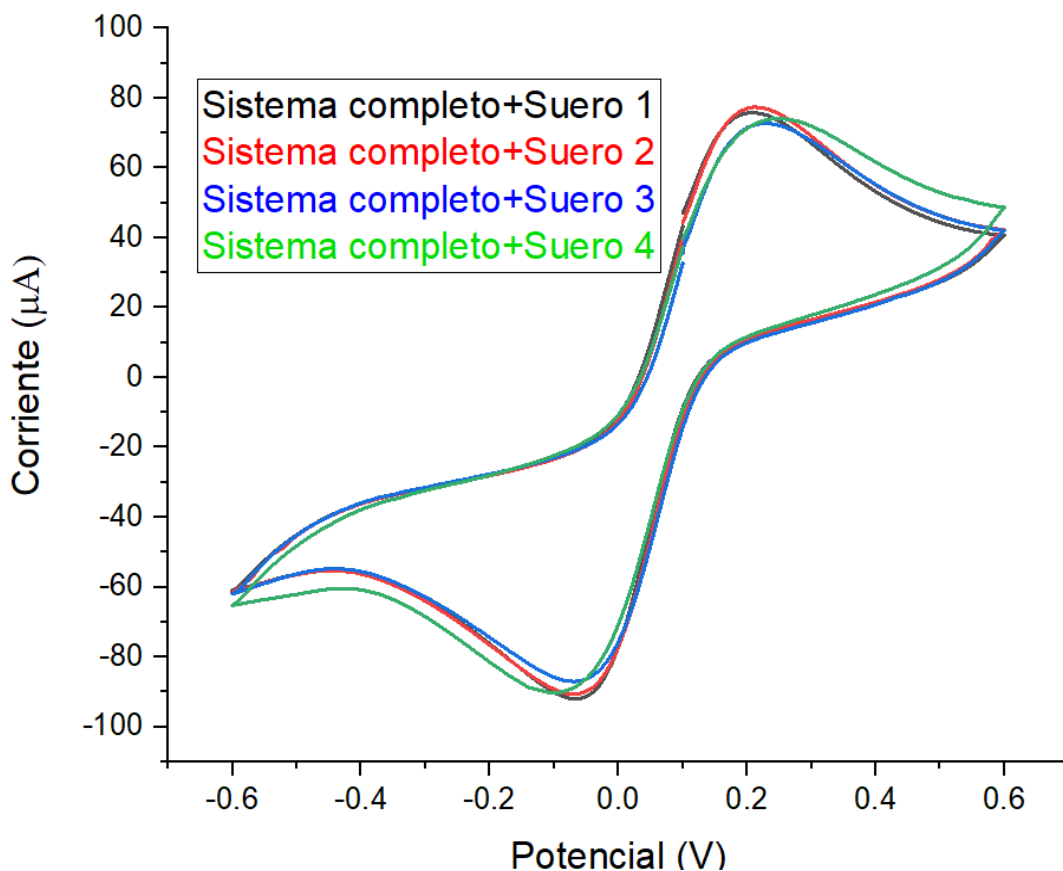


Figura 25. Voltamograma cíclico del análisis de muestras de suero. Muestra de suero 1 (negro). Suero 2 (rojo). Suero 3 (azul). Suero 4 (verde). Potencial con ciclos entre -0.6 y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM). **b)** Valores máximos de la corriente catódica para cada concentración.

La respuesta del biosensor para detectar la proteína S de SARS-CoV-2 en suero humano es representada en la figura 26, la detección de la proteína S se llevó a cabo mediante voltamperometría de pulso diferencial, como un primer indicio del comportamiento del biosensor se decidió usar concentraciones más altas a las reportadas en literatura. La lectura de $1 \mu\text{g/mL}$ en un rango de potencial -0.6 a 0.6 yendo en sentido positivo nos arroja el valor máximo del pico de oxidación en $53 \mu\text{A}$, por otro lado, las señales al usar 5 y $10 \mu\text{g/mL}$ presentaron valores de 51 y $48 \mu\text{A}$ respectivamente. La tendencia decreciente se mantuvo también en el pico de reducción demostrando estabilidad en el sistema y la ausencia de señales inespecíficas como se muestra en la figura 26.

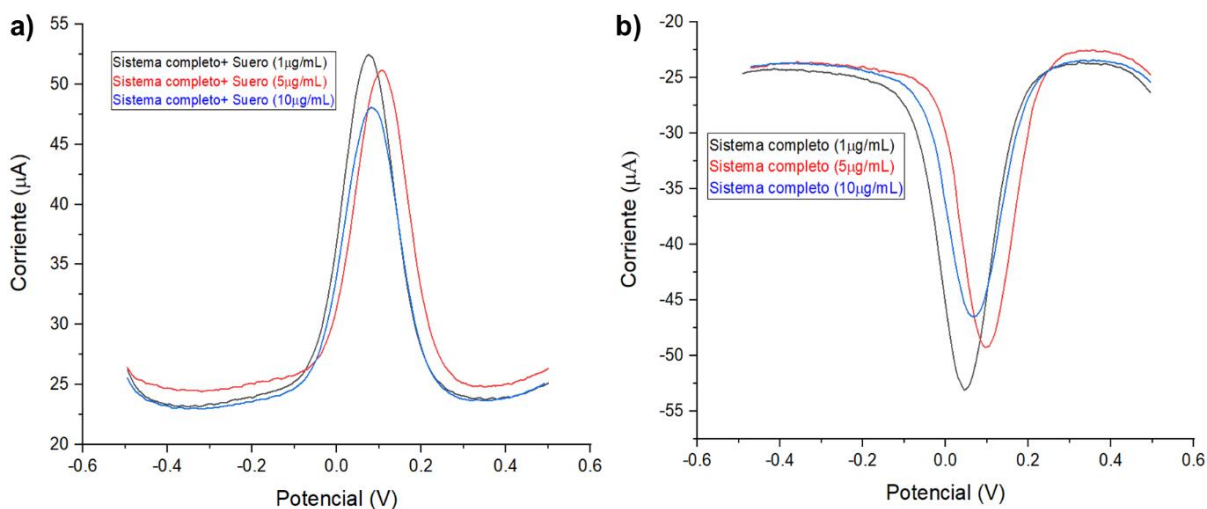


Figura 26. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 1. a) Pico de oxidación b) Pico de reducción. Suero suplementado con la proteína S: 1 µg/mL (negro). 5 µg/mL (rojo). 10 µg/mL (azul). Potencial de -0.5 a 0.5 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs⁻¹, con el electrolito de ferrocianuro de potasio (K₄Fe(CN)₆, 10 mM). **b)** Pico de reducción en rango de -0.5 a 0.5 V.

Dada la respuesta positiva que tuvo el sistema ante las concentraciones altas de proteína S en la muestra de suero sanguíneo humano, se procedió a llevar a cabo una curva de calibración con concentraciones menores de proteína S. Para ello en la figura 27 se muestra el empleo de diversas concentraciones del analito de interés, yendo de 0 a 100 ng/mL. La corriente máxima registrada para el pico de oxidación en las diversas concentraciones osciló entre 52 y 44 µA. Sin embargo, las concentraciones no presentaron una tendencia decreciente en su totalidad, pues las concentraciones de 10 y 40 ng/mL escapan de la tendencia esperada.

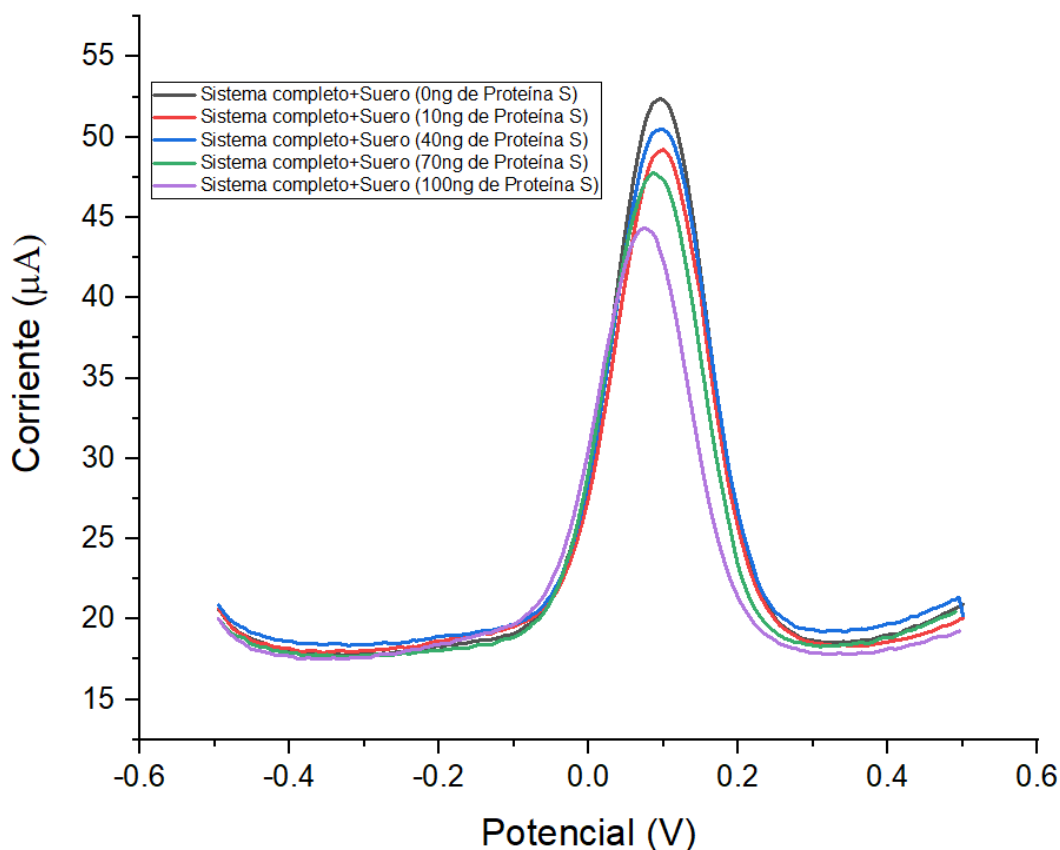


Figura 27. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 2. Suero sin suplementar (negro). Suero suplementado con la proteína S: 10 ng/mL (rojo). 40 ng/mL (azul). 70 µg/mL (verde). 100 ng/mL (morado). Potencial entre -0.5 y 0.5 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM).

Tras los resultados obtenidos en la primera curva de calibración se decidió repetir el ensayo en donde de nueva cuenta las concentraciones no presentaron una tendencia decreciente en corriente con respecto al aumento en las concentraciones de proteína S. Al contrario de la primera curva de calibración, en la repetición mostrada en la figura 28 las concentraciones de 70 y 100 ng/mL fueron las lecturas que pierden la tendencia decreciente, por ello se decidió trabajar en nuevos rangos de concentración de la proteína S, aumentado los empleados hasta el momento.

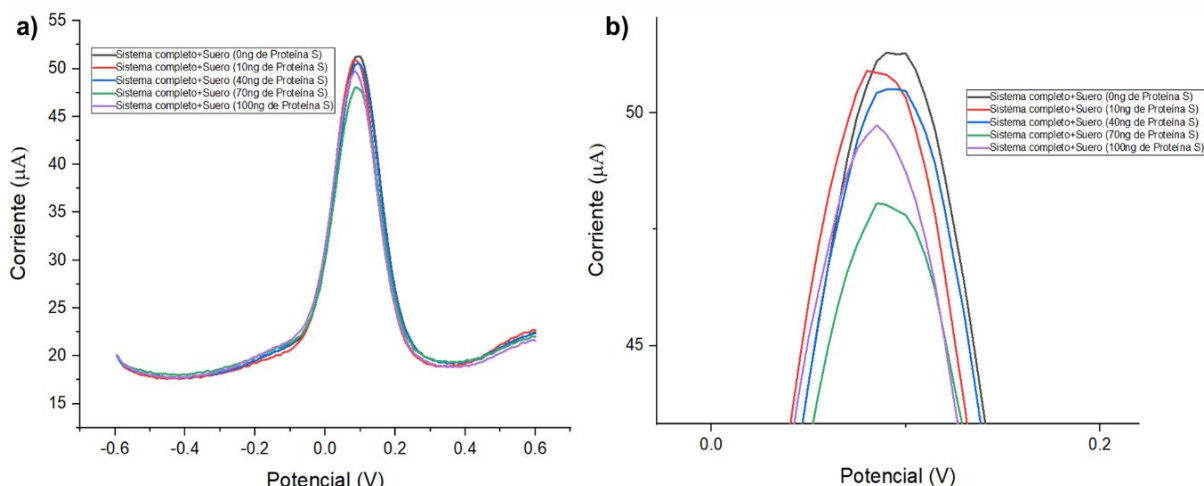


Figura 28. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 3. a) Suero sin suplementar (negro). Suero suplementado con la proteína S: 10 ng/mL (rojo). 40 ng/mL (azul). 70 ng/mL (verde). 100 ng/mL (morado). Potencial entre -0.6 y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM). **b)** Pico de oxidación en rango de 0 a 0.2 V.

Se decidió aumentar los rangos de concentración de la proteína S para su detección en muestras de suero, siendo ahora un rango de 0 a 300 ng/mL. La figura 29 muestra los resultados de la nueva curva de calibración en donde todas las lecturas presentan la tendencia decreciente esperada en el sistema. Las lecturas obtenidas en la nueva curva de calibración arrojaron corrientes máximas de entre 41 y 37 μA respectivamente. Ante este resultado se decidió seguir trabajando con las nuevas concentraciones de proteína S.

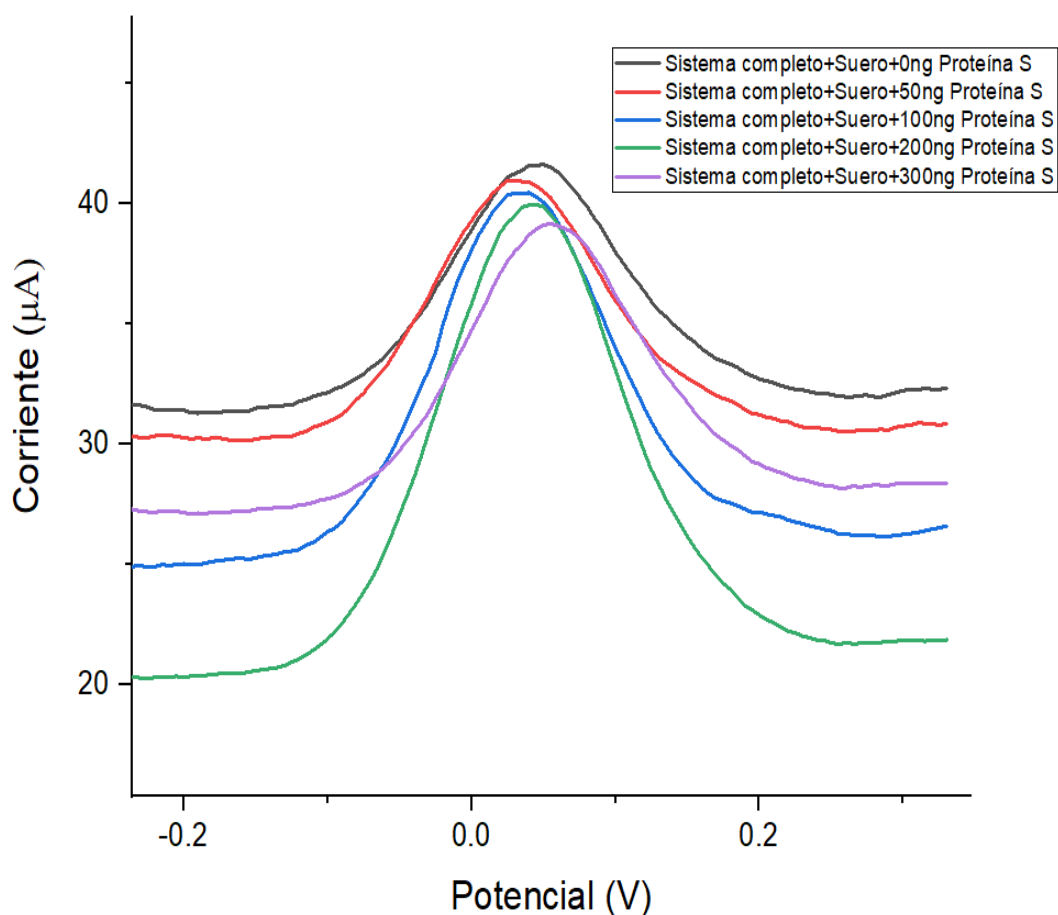


Figura 29. Voltamograma de pulso diferencial del suero suplementado con la proteína S repetición 4. Suero sin suplementar (negro). Suero suplementado con la proteína S: 50 ng/mL (rojo). 100 ng/mL (azul). 200 ng/mL (verde). 300 ng/mL (morado). Potencial entre -0.6 y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM).

Una vez obtenidas la curva de calibración se procedió a analizar 13 muestras de suero sanguíneo de pacientes positivos a SARS-CoV-2. En la figura 30 se observa que la totalidad de las muestras analizadas registraron un valor menor de corriente en comparación con la curva de calibración realizada previamente, las 13 muestras obtuvieron valores oscilantes entre 15 y 27 μA .

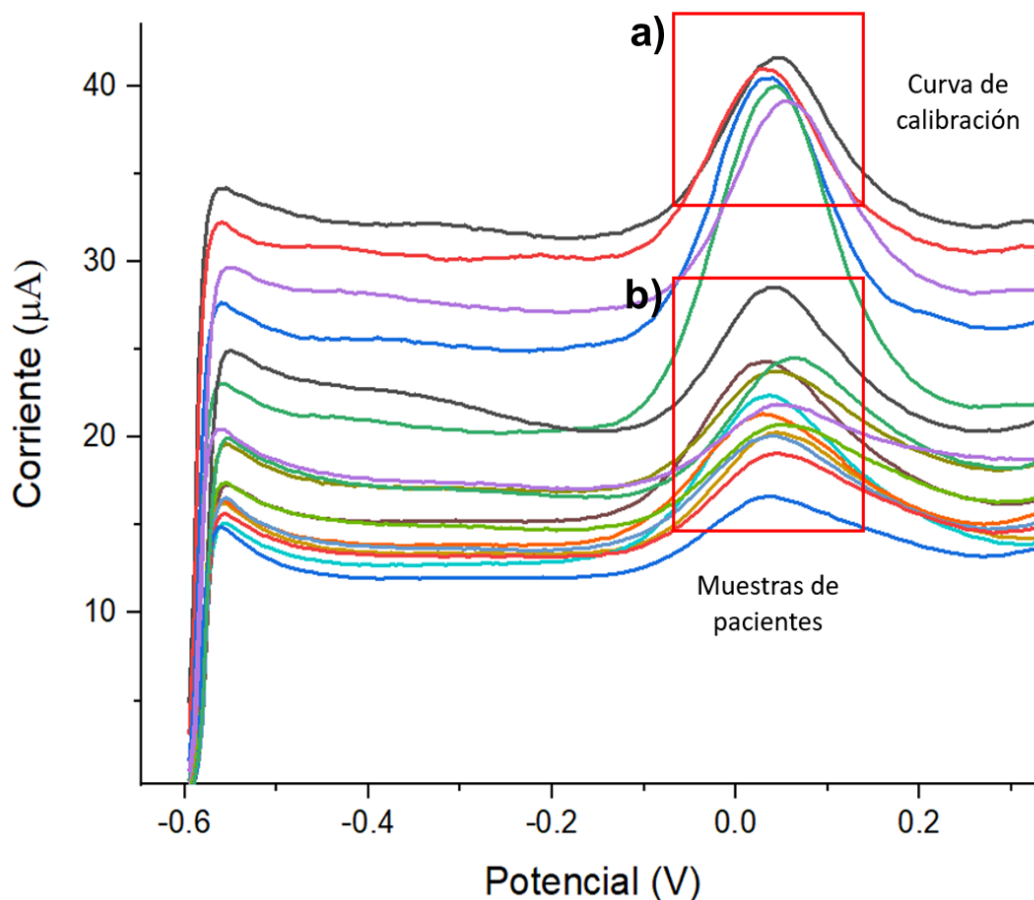


Figura 30. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de pacientes. a) Curva de calibración de la proteína S. **b)** Análisis de las muestras de pacientes positivos para SARS-CoV-2. Potencial entre -0.6 y 0.6 V (vs Ag) con una velocidad de escaneo de 50 mVs^{-1} , con el electrolito de ferrocianuro de potasio ($\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$, 10 mM).

La figura 31, 32 y 33 muestra el análisis de 10 muestras de hisopados nasofaríngeos suplementados con concentraciones de la proteína S en un rango de 0 a 300 ng/mL. En las ocho muestras analizadas en este ensayo se presentó un corriente decreciente con relación al aumento de en la concentración de proteína S adicionada al medio biológico, siete de las muestras presentaron puntos de corriente máxima de oxidación similares entre ellas oscilando 39 y 42 μA para la concentración de 0 ng/mL y de 34 μA para la concentración de 300 ng/mL.

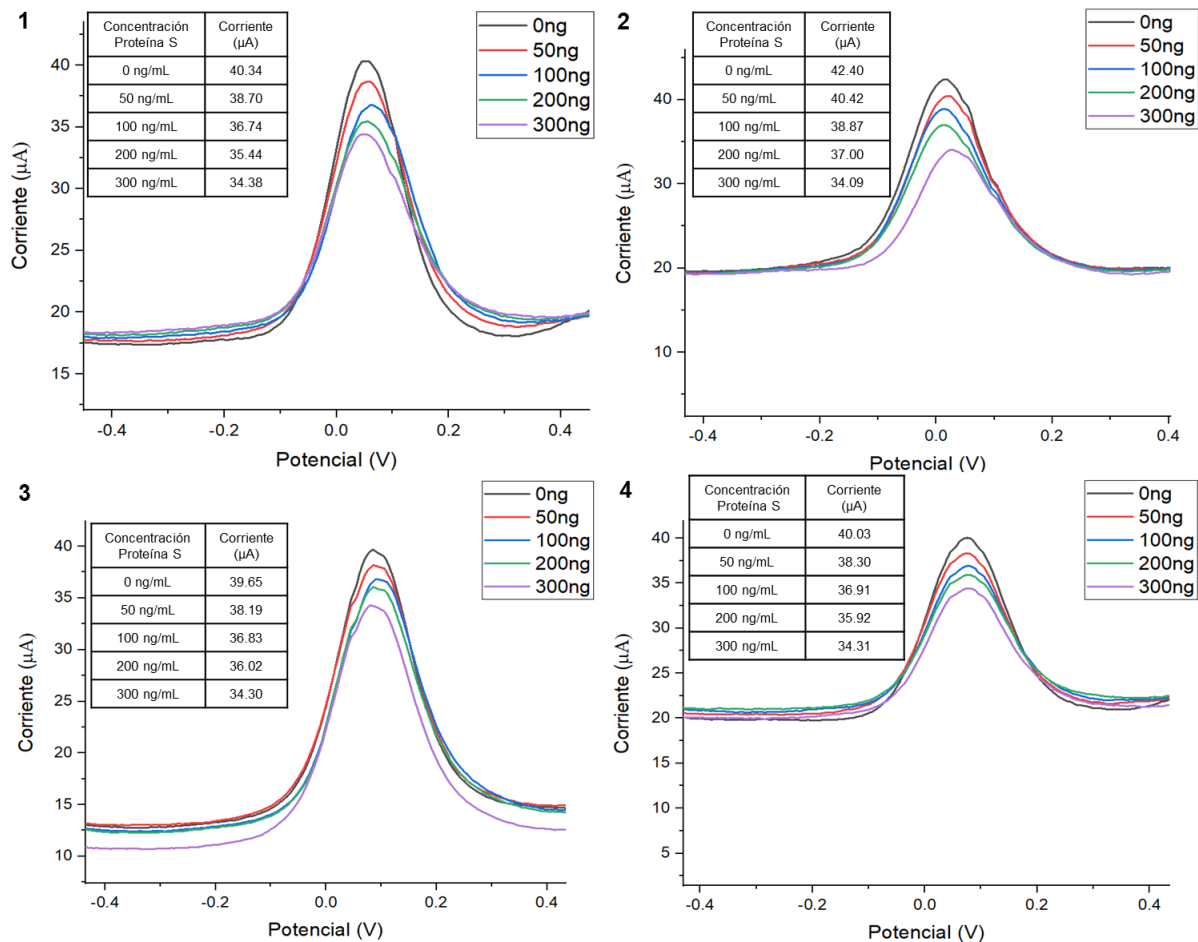


Figura 31. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de hisopado nasofaríngeo de pacientes. Muestras 1-4.

En la figura 32 se presenta una anomalía en la lectura de la muestra 3 en donde todos los resultados obtenidos si bien mantienen la tendencia decreciente esperada, éstas se encuentran más bajas a las del resto de muestras oscilando entre 35 y 31 μA .

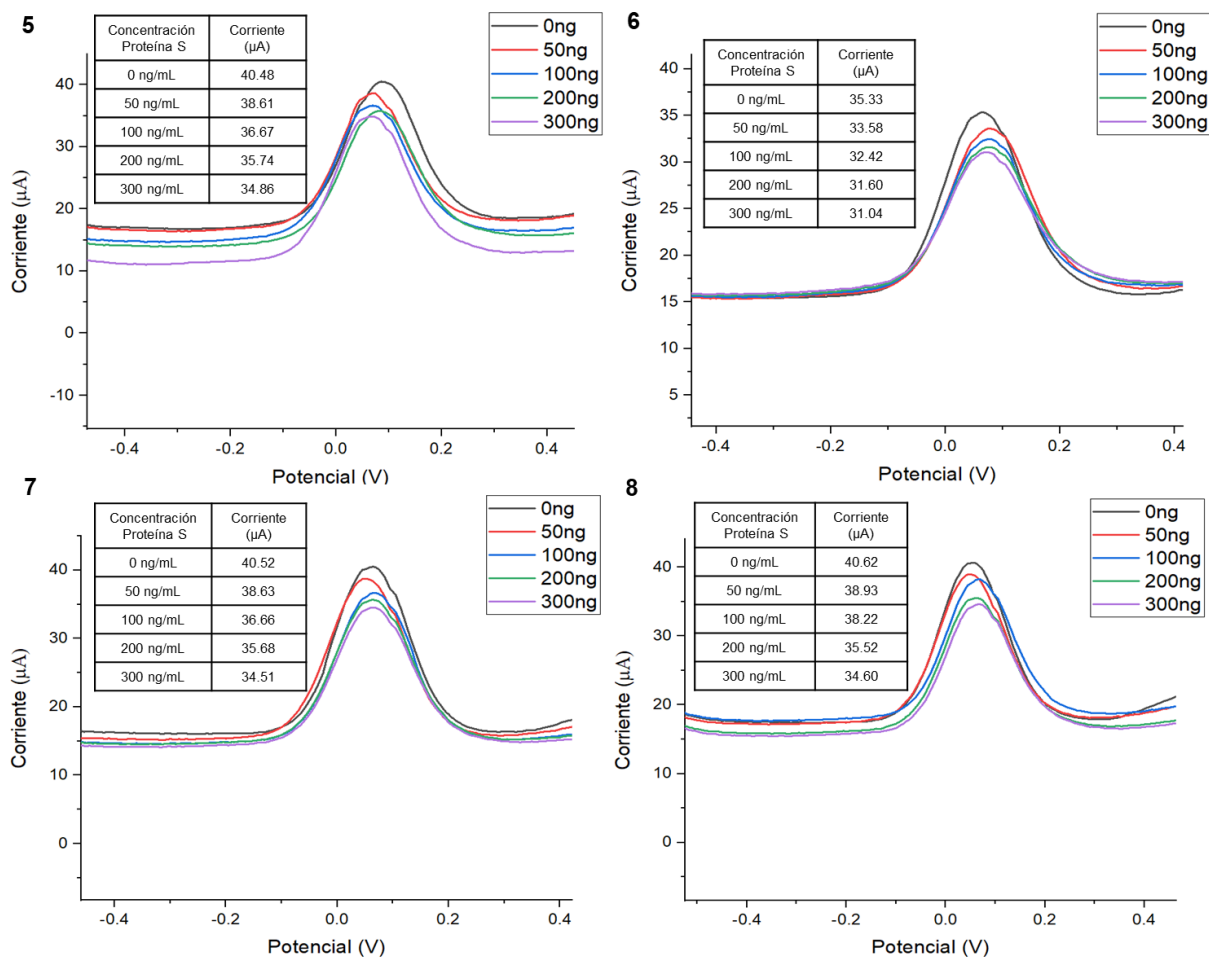


Figura 32. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de hisopado nasofaríngeo de pacientes. Muestras 5-8.

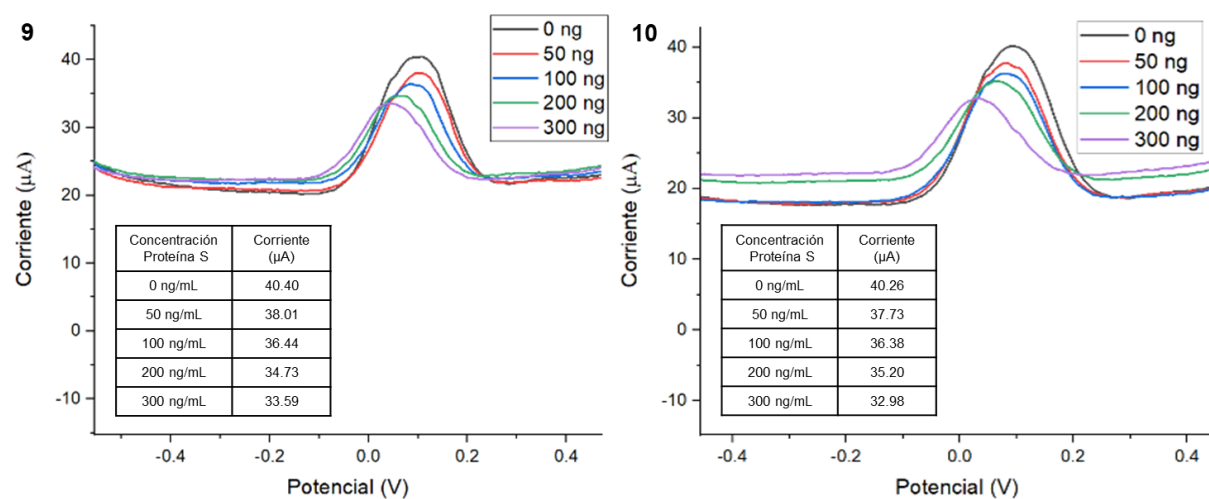


Figura 33. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de hisopado nasofaríngeo de pacientes. Muestras 9-10.

Al graficar las corrientes máximas obtenidas en cada concentración en la figura 34 se observa la diferencia entre los valores obtenidos en la muestra 6 con respecto al resto de lecturas, así como la homogeneidad existente entre el resto de los datos.

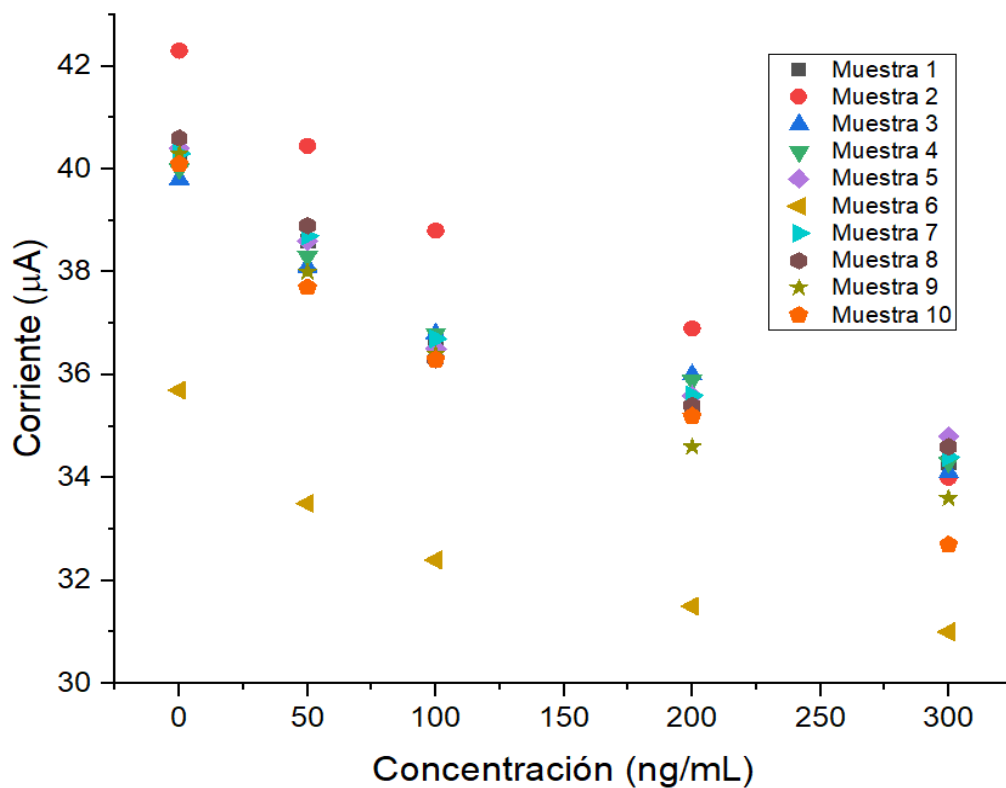


Figura 34. Gráfica de I_p de las muestras de hisopados nasofaríngeos de los pacientes analizados.

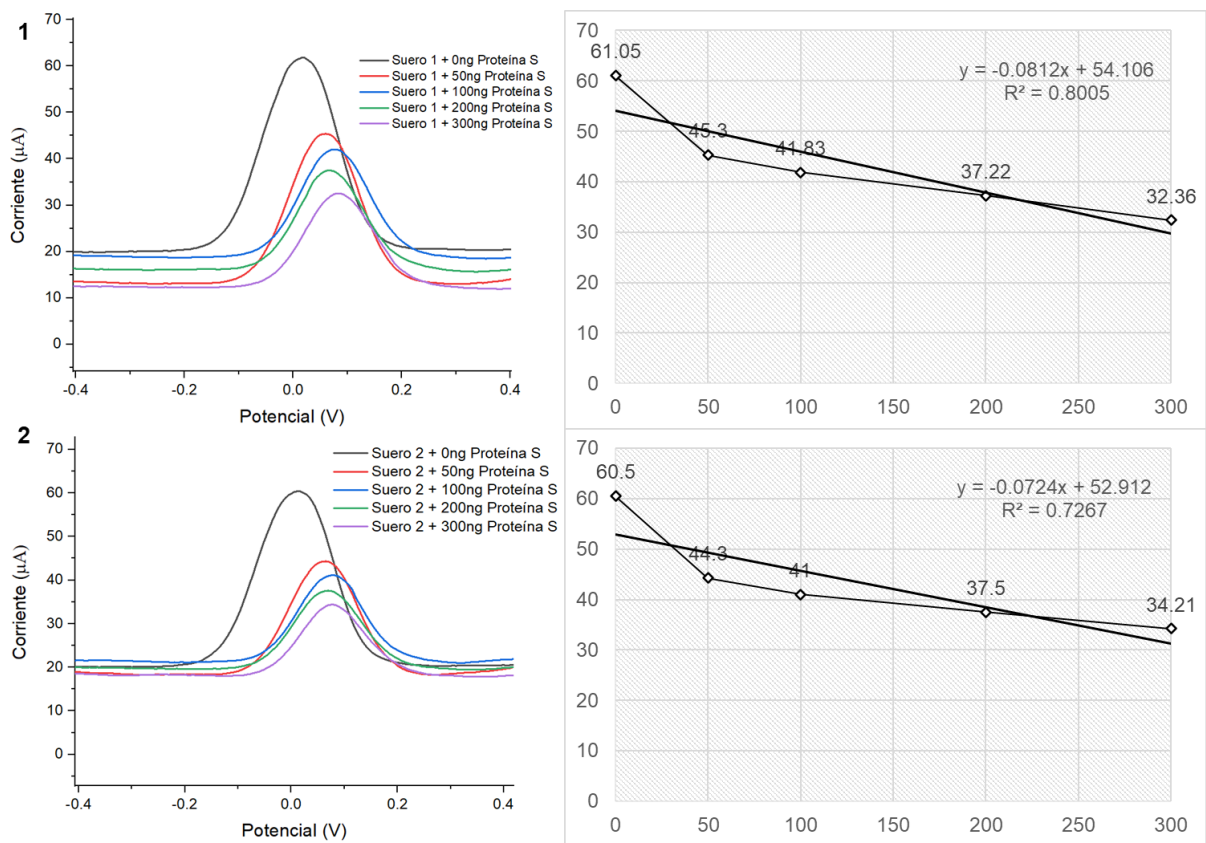


Figura 35. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de suero pacientes. Muestras 1-2.

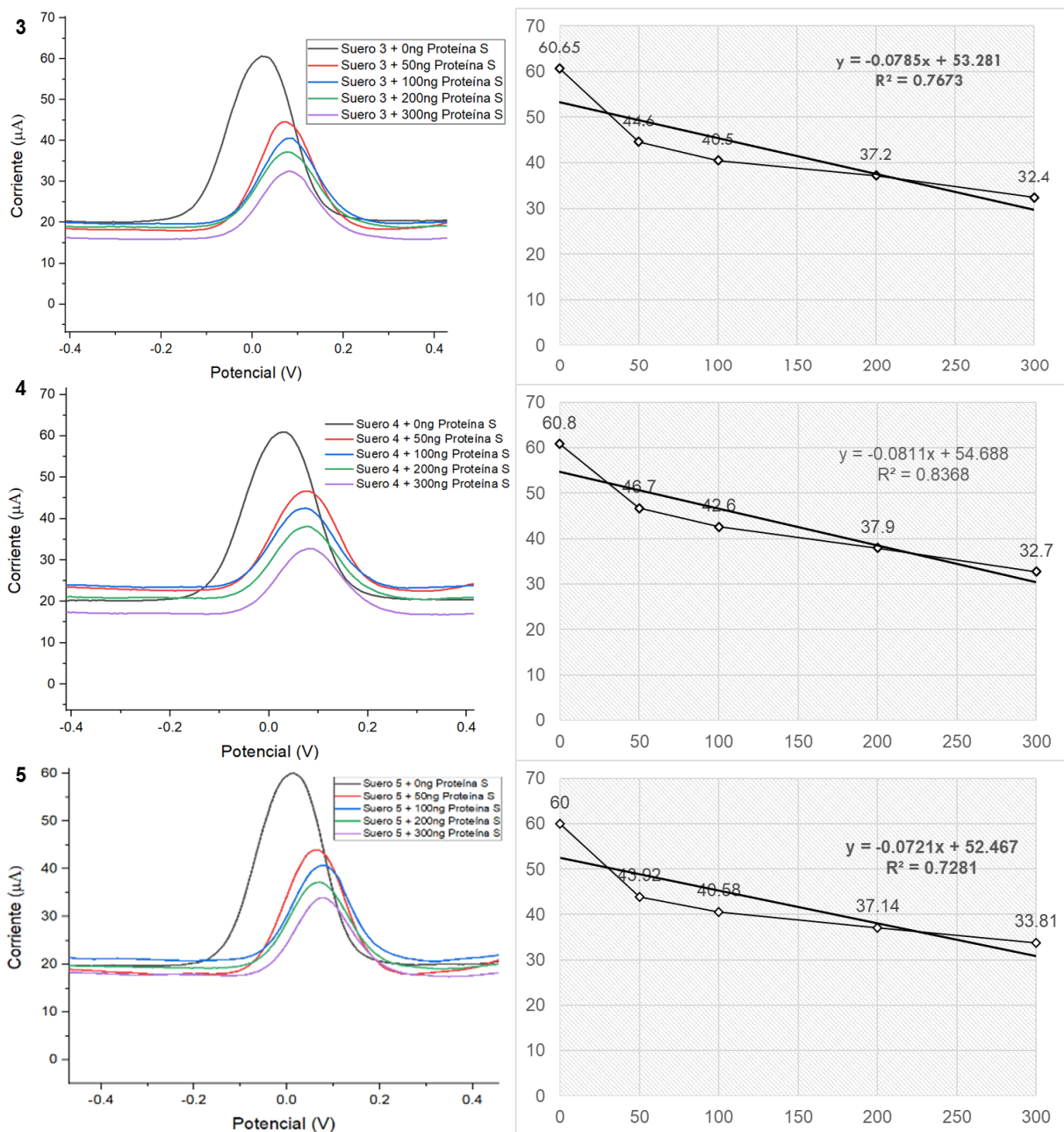


Figura 36. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de sueros de pacientes. Muestras 3-5.

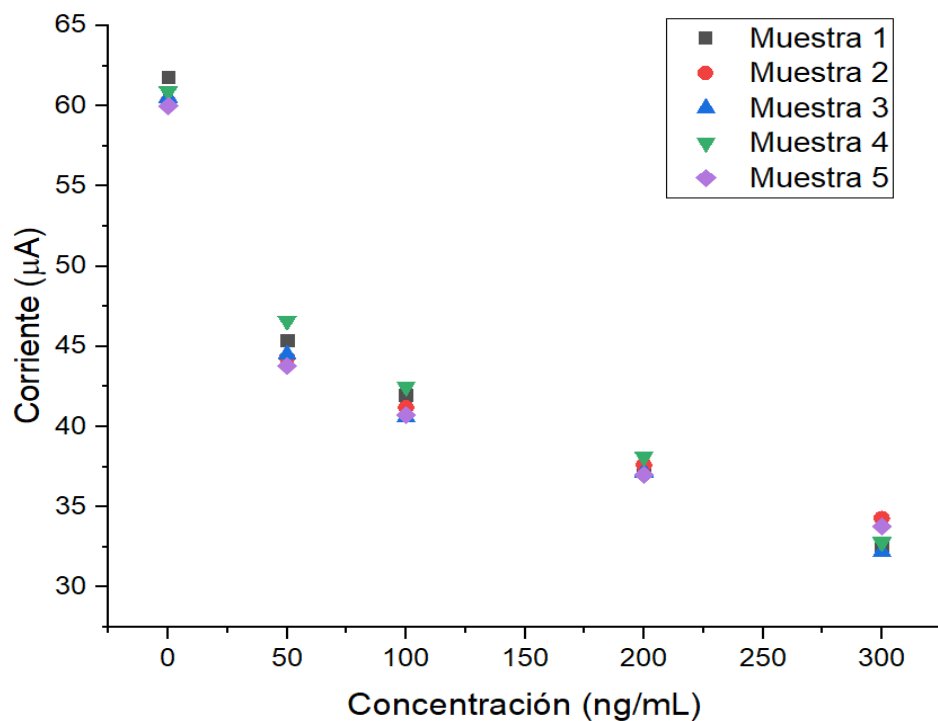


Figura 37. Voltamograma de pulso diferencial de la curva de calibración y de muestras de sueros de pacientes. Muestras 3-5.

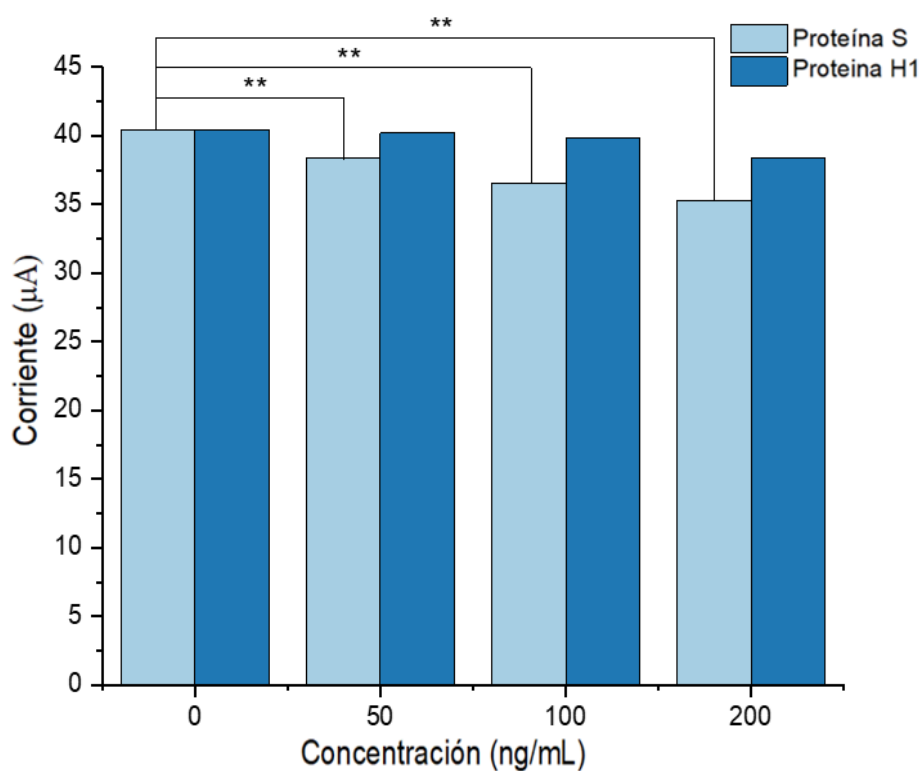


Figura 38. Análisis de especificidad del biosensor en muestras de hisopados nasofaríngeos humanos suplementados con proteína S y hemaglutinina de H1N1 respectivamente. ANOVA ($p < 0.005$). Tukey.

8. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos durante la síntesis de nanomateriales permitieron caracterizar con claridad la identidad en composición, morfología y propiedades de estos. Como podemos observar en la figura 12, la elaboración de núcleos magnéticos mediante el procesos de coprecipitación fue exitoso la presentar estructuras cercanas a los 10 nm tal y como reporta la literatura, los patrones cristalinos presentes en la microscopia corresponden a una de las características más representativas de las nanopartículas de óxido de hierro, de igual manera a pesar que se manera unitaria las estructuras presentaban el tamaño previamente mencionado, la mayoría de las mismas presentaban un grado de aglomeración, éste fenómeno se encuentra plenamente reportado como una de las consecuencias de presentar una alta energía libre en superficie por parte de este tipo de materiales, dicha característica pudiera verse aminorada mediante el uso de agente surfactantes o estabilizadores que permitiera una distribución más homogénea en el medio (Hachani et al., 2016; Ozel y Kockar, 2017; LaGrow et al., 2019). Una vez sintetizados y caracterizados los núcleos magnéticos se procedió a adicionar una capa de carbono usando curcumina como fuente de este material a través de un proceso de síntesis hidrotermal. Tal como se muestra en la figura 12 el proceso de llevar a cabo la estructura core shell fue exitoso, demostrándose mediante microscopia electrónica la adición de una capa fina de carbón que oscila entre los 2-3 nm de grosor manteniendo el núcleo magnético deseado, el uso de metodologías como la síntesis hidrotermal para la obtención de estructuras core shell ha sido propuesto por encima de otras metodologías debido características inherentes a estos procesos (Zhang et al., 2006; Kawasaki et al., 2009) como pueden ser los cambios de densidad en medios acuosos y cambios en la constante dieléctrica del agua, lo cual se refleja como una alta solubilidad de iones en altas densidades de agua, favoreciendo el crecimiento de partículas y la nucleación heterogénea, mientras que en casos donde la densidad de agua disminuye como en el procesos realizado en este trabajo, la nucleación se vuelve más homogénea debido a un alto grado de sobresaturación (Sawai y Oshima, 2008; Mansournia y Ghaderi, 2017).

Las figuras 13, 14 y 15 nos muestran la caracterización de las nanopartículas de oro obtenidas mediante el proceso de reducción empleando citrato de sodio. Los tamaños de las nanopartículas de oro obtenidas mediante la reducción de citrato de sodio oscilaron entre 40-50 nm correspondiendo con los tamaños reportados previamente en procesos similares, de igual

manera el análisis de plasmón obtenido mediante UV-Vis corresponde al esperado en 520 nm siendo éste característico para las nanopartículas de oro coloidales (Viet Long et al., 2013; Chen et al., 2014). El análisis de composición por EDS arrojó la obtención de material de oro nanopartículas con señales de mayor intensidad en 0.5 y 2.4 keV, siendo las señales de oro reportadas en estados nanométrica, aunado a la señal presentada por el oro, un alto porcentaje de carbono fue descrito como presente en la muestra, esto puede explicarse debido a que la rejilla en donde fueron depositadas las nanopartículas de oro está compuesta por carbono (Giráldez-Pérez et al., 2022; Wang et al., 2022).

Para analizar las cualidades electrocatalíticas de los materiales sintetizados se realizó la inmovilización de las nanopartículas sobre el electrodo de trabajo de los SPCEs y posteriormente se analizó mediante voltamperometría cíclica (Figura 17), coincidiendo con reportes previos los materiales que mayor conductividad aportaron al sistema fueron el oro y los GQD. Aunque los reportes indican un mayor potencial de aplicación por características como alta área superficial, facilidad de elaborar redes π y en general una mejor actividad electrocatalítica en comparación al oro (Guin et al., 2018), en nuestro análisis este supuesto no se cumplió debido al valor máximo de corriente presentado por GQD (2.36 μA) en comparación con las nanopartículas de oro (5.97 μA), una posible explicación a esta situación es que en ocasiones las características ópticas y electrocatalíticas de los quantum dots pueden estar contrapuestas, pues mientras características como tamaño, forma y condiciones del medio pueden potenciar las propiedades ópticas, estas se interpondrán en la cualidades electrocatalíticas de dichas estructuras, para dar una explicación más certera a esta situación se requieren análisis adiciones de estas estructuras (Rani et al., 2022).

Una vez determinado que las nanopartículas de oro en conjunción con el SPCE era la mejor opción para elaborar el biosensor se procedió a estandarizar la inmovilización de dichas estructuras en el electrodo de trabajo correspondiente, los sistemas basados en detección electroquímica son susceptibles de forma importante a mostrar variaciones en las mediciones con base al monto final de material electrocatalítico, así como presentar dificultades para obtener una cobertura homogénea del material electrocatalítico, es por ello que se decidió electrodepositar las nanopartículas de oro, este método permite llevar a cabo la nucleación de las sales de oro usadas como precursores mediante la aplicación de un potencial eléctrico, en

este caso usando un rango de -1.5 a 0.6 V con una velocidad de escaneo de 100 mVs^{-1} , obteniendo de esta manera una cobertura de nanopartículas de oro inmovilizadas sobre toda la superficie del electrodo de trabajo y propiciando de esta manera la homogeneidad en las lecturas presentadas en las figuras 18 y 19 (Wahyuni et al., 2018; Chiang et al., 2019).

El análisis electroquímico de las nanopartículas de oro inmovilizadas sobre el electrodo de trabajo presentado en la figura 20, demostró un aumento sustancial de la corriente con respecto al electrodo sin modificar, este resultado corresponde con lo que se esperaba del sistema una vez se encontrara una cubierta uniforme y estable de nanopartículas, las propiedades electrocatalíticas del oro se encuentran bien descritas dadas su característica como facilitador en la transferencia de electrones, esto aunado a que estructuras nanométricas de materiales conductivos permiten potencial las cualidades que los materiales pueden presentar a escalas macrométricas (Jothi et al., 2020; Hou et al., 2021; Mahalakshmi y Sridevi, 2021).

Para cumplir con la inmovilización del anticuerpo anti-S de SARS-CoV-2 se empleó los elementos de conjugación EDC-NHS, los cuales en conjunto con las características intrínsecas de conjugación electrostáticas que presentan las nanopartículas de oro permiten conjugar los enlaces carboxilo presentes en dichas estructuras con los enlaces amino presentes en los anticuerpos, formando así los nanocomplejos necesarios para el reconocimiento de la proteína viral. Como medio para corroborar la correcta inmovilización de los anticuerpos en el sistema se realizó un análisis mediante SEM-EDS como se muestra en las figuras 21, 22 y 23. El electrodo sin modificar presenta únicamente carbón en su superficie al no encontrar ningún elemento inmovilizado en su superficie, por su parte la aseveración de la correcta inmovilización del anticuerpo proviene de los datos presentes en las figuras 22 y 23, donde en primer instancia podemos encontrar únicamente la presencia de elementos como carbono, oro y cloro provenientes de la composición original del electrodo, así como de las nanopartículas inmovilizadas, el cloro puede explicarse debido a que el agente precursor de las nanopartículas de oro es el ácido cloroháurico en contraste la figura 23 no únicamente presenta los elementos anteriormente comentados sino que se adiciona una proporción significativa de nitrógeno, elemento ausente en el resto de elementos, estas cantidades de nitrógeno solo puede provenir del anticuerpo presente en el sistema, pues los análisis fueron efectuados en condiciones sin la adición de este elemento.

El biosensor fue construido en diversas etapas de adición de componentes, yendo desde la electrodeposición de las nanopartículas de oro hasta la adición del BSA fungiendo como agente de bloqueo, para determinar la correcta inmovilización de los componentes se decidió emplear la voltamperometría cíclica para analizar los cambios generados en la corriente, únicamente las nanopartículas de oro corresponden a un elemento conductor por lo cual la electrodeposición en el electrodo de trabajo del SPCE generó un aumento en la corriente, esto en contraste con el resto de elementos, los cuales al no ser conductores aminoran la corriente del sistema (Figura 24), este fenómeno puede explicarse debido a la formación de una capa de difusión entre la superficie del electrodo y del medio, la cual dificulta en cierta medida el paso de electrones del electrolito al electrodo, la formación y crecimiento en la capa de difusión puede ser aprovechado como una señal indirecta de la modificación superficial del electrodo, denotando de dicha manera el correcto posicionamiento de los componentes del sistema (Buk y Pemble, 2019; Saenchoopa et al., 2021).

Comprobada la correcta inmovilización de los elementos que componen al biosensor se prosiguió a demostrar la repetibilidad y estabilidad del sistema tanto en su construcción como al ser adicionado con muestras de suero humano (Figura 25) en donde al analizarse mediante voltamperometría cíclica se demostró la ausencia de señales inespecíficas o cambios importantes en los picos de oxidación y reducción en las cuatro muestras de suero analizadas, registrando cada una de las repeticiones corrientes máximas de 90 μA tanto para oxidación como para reducción. Demostrando de esta manera la robustez del sistema en su preparación.

En la figura 26 se muestra la capacidad del sistema para detectar concentraciones conocidas de la proteína S de SARS-CoV-2, la cual fue suplementada en muestras de suero provenientes de donadores sin registro de infección por este agente viral. Para la detección de la proteína S se tomaron como punto de partida 3 concentraciones superiores a las reportadas por trabajos similares, los cuales refieren las capacidades de detección entre el rango de femto a nanogramos por mililitro, como una primera instancia de exploración para determinar la capacidades del biosensor se acordó comenzar con concentraciones de 1-10 $\mu\text{g/mL}$ de la proteína S, siendo la técnica de voltamperometría de pulso diferencias la herramienta electroquímica elegida debido a la sencillez en su interpretación. La prueba fue repetida en dos ocasiones usando un potencial entre -0.6 a 0.6 V en sentido positivo y negativo respectivamente,

en cada análisis de la tendencia decreciente del sistema fue apreciable con respecto al aumento en la concentración de la proteína S, obteniendo señales oscilantes entre los 53 y 48 μA en el pico de oxidación y entre 52 y 45 μA para las señales de reducción cumpliendo de esta manera con la respuesta esperada del sistema (Vásquez y Orozco, 2023; Yonker et al., 2023).

Demostrada la funcionalidad del biosensor en concentraciones altas de la proteína se procedió a disminuir las concentraciones de proteína S analizada ahora empleando un rango de 0-100 ng/mL aunque como se observa en la figura 27 la tendencia decreciente en contraposición al aumento en la concentración de la proteína S, sin embargo, en análisis subsecuentes la tendencia decreciente se perdió como se muestra en la figura 28, por lo cual no fue posible realizar análisis de repetibilidad que fueran fiables. Los valores arbitrarios en la corriente máxima del sistema se presentaban cuando la diferencia entre las concentraciones oscilaba entre los 30 y 40 ng/mL, demostrando que el sistema permitía identificar de forma confiable diferencias mayores o iguales a 50 ng/mL. Para solventar el inconveniente presentado se optó por realizar curvas de calibración con rangos de concentración más amplios empleando un rango de 0-300 ng/mL siendo de esta manera como pudo recuperarse la tendencia decreciente esperada conforme se presentaba el aumento en la concentración de proteína S en el medio. Sistemas similares al reportado en este trabajo han presentado límites de detección de hasta 0.1 ag/mL en fluidos como PBS, saliva e hisopados nasofaríngeos, nuestro sistema no presenta la capacidad de una detección tan sensible debido a no contar con etiquetas de marcaje, segundos anticuerpos o sistemas de concentración (Pan et al., 2020; Torrente-Rodriguez et al., 2020; Fabiani et al., 2021; Liv et al., 2021).

Para analizar la repetibilidad y estabilidad del sistema ante diversos fluidos biológicos se prosiguió a realizar diversas lecturas de hisopados nasofaríngeos y muestras de suero suplementados en con proteína S. Se realizaron 10 lecturas de muestras de hisopados nasofaríngeos (Figura 31-34) en donde 9 de las 10 muestras arrojaron resultados sumamente similares, sin embargo, la muestra 6 demostró valores sumamente bajos en contraste con el resto de las muestras, aunque no se pudo contar con un análisis complementario de ese donador, se pudo obtener la información que el mismo fue positivo para SARS-CoV-2 en días posteriores a la prueba, justificando de esta manera la variación en las lecturas.

Por otro lado, se analizaron 5 muestras de suero de donadores sin registro de infección previa por SARS-CoV-2, en las figuras 35-37 se demuestra la capacidad del sensor para la detección de la proteína S en suero sin la presencia de alteraciones en el análisis de repetibilidad, aunado a la ausencia de señales inespecíficas que pudieran provenir del medio, se demuestras que factores tales como las altas concentraciones de albumina no propician el ruido extrínseco en el sistema.

Demostrado que el sistema es capaz de identificar a la proteína S de SARS-CoV-2 en los medios biológicos, se procedió a realizar un análisis de especificidad del sistema, retando a nuestro biosensor contra las concentraciones conocidas de la proteína S y de la proteína H1 del virus de la influenza, la cual pese a provenir de un virus respiratorio no demostró generar diferencias significativas en los valores de corriente obtenidos como si lo demostró propiciar la proteína S.

9. CONCLUSIONES

1. Se logró sintetizar y caracterizar nanopartículas de carbono, óxido de hierro, oro y Quantum dots de grafeno.
2. Se cumplió con el análisis de las propiedades electrocatalíticas del conjunto electrodo serigrafiado/nanopartículas.
3. Se sintetizaron y caracterizaron nanoconjugados nanopartícula/anticuerpos anti-S del virus SARS-CoV-2.
4. Se determinó la capacidad del sistema para la detección de la proteína S del virus SARS-CoV-2 en muestras de fluidos biológicos.

10. PERSPECTIVAS

El funcionamiento del dispositivo ha demostrado la capacidad de identificar de manera sensible y específica la proteína S del virus SARS-CoV-2 no solo en medios de composición controlada como los buffers, sino también en muestras de origen biológico; sin embargo el sistema debe seguir siendo retado ante muestras de diversa naturaleza, siendo necesario para una validación completa la implementación de curvas de calibración mediante el uso de agentes pseudovirales o muestras de pacientes positivos a SARS-CoV-2 con carga viral conocida, aunado al incremento en la muestra poblacional empleada para el desarrollo de este proyecto. Por otro lado, se considera de importancia realizar la evaluación de procesos de detección mediante técnicas electroquímicas como espectroscopia de impedancia electroquímica, pues en trabajos recientes los dispositivos desarrollados que usan esta técnica como medio de detección han alcanzado sensibilidades que oscilan en el rango de pico a femtogramos de proteína viral por mililitro de muestra siendo una alternativa para intentar aumentar la sensibilidad del biosensor reportada en este trabajo.

11. REFERENCIAS

- Alhadrami HA. 2018. Biosensors: classifications, medical applications, and future prospective. *Biotechnology and applied biochemistry*, 65(3), 497-508.
- Ali J, Najeeb J, Ali MA, Aslam MF, Raza A. 2017. Biosensors: their fundamentals, designs, types and most recent impactful applications: a review. *Biosensors and Bioelectronics*, 8(1).
- Bai J, Beyer S, Trau D. 2011. Conjugated polymers for Biosensor devices.
- Buk V, Pemble ME. 2019. A highly sensitive glucose biosensor based on a micro disk array electrode design modified with carbon quantum dots and gold nanoparticles. *Electrochimica Acta*, 298, 97-105.
- Campuzano S, Yáñez-Sedeño P, Pingarrón JM. 2019. Carbon dots and graphene quantum dots in electrochemical biosensing. *Nanomaterials*, 9(4), 634.
- Chen C, Wang J. 2020. Optical biosensors: an exhaustive and comprehensive review. *Analyst*, 145(5), 1605-1628.
- Chen F, Wang Y, Ma J, Yang G. 2014. A biocompatible synthesis of gold nanoparticles by Tris (hydroxymethyl) aminomethane. *Nanoscale Research Letters*, 9(1), 1-6.
- Chiang HC, Wang Y, Zhang Q, Levon K. 2019. Optimization of the electrodeposition of gold nanoparticles for the application of highly sensitive, label-free biosensor. *Biosensors*, 9(2), 50.
- Cho IH, Kim DH, Park S. 2020. Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. *Biomaterials Research*, 24(1), 1-12.
- Cho IH, Lee J, Kim J, Kang MS, Paik J, Ku S, Kim DH. 2018. Current technologies of electrochemical immunosensors: perspective on signal amplification. *Sensors*, 18(1), 207.
- Cui J, Li F, Shi ZL. 2019. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. *Nature Reviews Microbiology*, 17(3), 181-192.
- Dai L, Zheng T, Xu K, Han Y, Xu L, Huang E, Gao GF. 2020. A Universal Design of Betacoronavirus Vaccines against COVID-19, MERS, and SARS. *Cell*, 182(3), 722-733.e11.

- Ding J, Qin W. 2020. Recent advances in potentiometric biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 124, 115803.
- Du L, Tai W, Zhou Y, Jiang S. 2016. Vaccines for the prevention against the threat of MERS-CoV. *Expert review of vaccines*, 15(9), 1123-1134.
- Fabiani L, Saroglia M, Galatà G, De Santis R, Fillo S, Luca V, Arduini F. 2021. Magnetic beads combined with carbon black-based screen-printed electrodes for COVID-19: A reliable and miniaturized electrochemical immunosensor for SARS-CoV-2 detection in saliva. *Biosensors and Bioelectronics*, 171, 112686.
- Giráldez-Pérez RM, Grueso EM, Jiménez-Aguayo R, Carbonero A, González-Bravo M, Kuliszewska E, Prado-Gotor R. 2022. Use of Nanoparticles to Prevent Resistance to Antibiotics—Synthesis and Characterization of Gold Nanosystems Based on Tetracycline. *Pharmaceutics*, 14(9), 1941.
- Guan JG, Miao YQ, Zhang QJ. 2004. Impedimetric biosensors. *Journal of bioscience and bioengineering*, 97(4), 219-226.
- Guin SK, Ambolikar AS, Guin JP, Neogy S. 2018. Exploring the excellent photophysical and electrochemical properties of graphene quantum dots for complementary sensing of uranium. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 272, 559-573.
- Hachani R, Lowdell M, Birchall M, Hervault A, Mertz D, Begin-Colin S, Thanh NTK. 2016. Polyol synthesis, functionalisation, and biocompatibility studies of superparamagnetic iron oxide nanoparticles as potential MRI contrast agents. *Nanoscale*, 8(6), 3278-3287.
- Han HJ, Yu H, Yu XJ. 2016. Evidence for zoonotic origins of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *The Journal of general virology*, 97(Pt 2), 274.
- He W, Hu ZH, Yuan S, Zhong WH, Mei YZ, Dai CC. 2018. Bacterial Bioreporter-Based Mercury and Phenanthrene Assessment in Yangtze River Delta Soils of China. *Journal of environmental quality*, 47:562-570.

- Hou C, Luo Q, He Y, Zhang H. 2021. Potentiostatic electrodeposition of gold nanoparticles: variation of electrocatalytic activity toward four targets. *Journal of Applied Electrochemistry*, 51, 1721-1730.
- Hoß SG, Bendas G. 2017. Mass-sensitive biosensor systems to determine the membrane interaction of analytes. In *Antibiotics* (pp. 145-157). Humana Press, New York, NY.
- Huang Y, Yang C, Xu XF, Xu W, Liu SW. 2020. Structural and functional properties of SARS-CoV-2 spike protein: potential antiviral drug development for COVID-19. *Acta Pharmacologica Sinica*, 1-9.
- Hu B, Zeng LP, Yang XL, Ge XY, Zhang W, Li B, Xie JZ, Shen XR, Zhang YZ, Wang N, Luo DS, Zheng XS, Wang MN, Daszak P, Wang LF, Cui J, Shi ZL. 2017. Discovery of a rich gene pool of bat SARS-related coronaviruses provides new insights into the origin of SARS coronavirus. *PLoS pathogens*, 13(11), e1006698.
- Iglesias-Mayor A, Amor-Gutiérrez O, Costa-García A, de la Escosura-Muñiz A. 2019. Nanoparticles as emerging labels in electrochemical immunosensors. *Sensors*, 19(23), 5137.
- IUPAC. Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed. (the "Gold Book"). Compiled by A. D. McNaught and A. Wilkinson. Blackwell Scientific Publications, Oxford (1997). Online version (2019) created by S. J. Chalk. ISBN 0-9678550-9-8.
- Jaiswal NK, Saxena SK. 2020. Classical Coronaviruses. In *Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)* (pp. 141-150). Springer, Singapore.
- Jothi L, Jaganathan SK, Nageswaran G. 2020. An electrodeposited Au nanoparticle/porous graphene nanoribbon composite for electrochemical detection of alpha-fetoprotein. *Materials Chemistry and Physics*, 242, 122514.
- Kadara RO, Jenkinson N, Banks CE. 2009. Characterisation of commercially available electrochemical sensing platforms. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 138(2), 556-562.
- Kawasaki SI, Xiuyi Y, Sue K, Hakuta Y, Suzuki A, Arai K. 2009. Continuous supercritical hydrothermal synthesis of controlled size and highly crystalline anatase TiO₂ nanoparticles. *The Journal of Supercritical Fluids*, 50(3), 276-282.

- Kim M, Iezzi Jr R, Shim BS, Martin DC. 2019. Impedimetric biosensors for detecting vascular endothelial growth factor (VEGF) based on poly (3, 4-ethylene dioxythiophene)(PEDOT)/gold nanoparticle (Au NP) composites. *Frontiers in chemistry*, 7, 234.
- LaGrow AP, Besenhard MO, Hodzic A, Sergides A, Bogart LK, Gavriilidis A, Thanh NTK. 2019. Unravelling the growth mechanism of the co-precipitation of iron oxide nanoparticles with the aid of synchrotron X-Ray diffraction in solution. *Nanoscale*, 11(14), 6620-6628.
- Liu L, Deng D, Sun W, Yang X, Yang S, He S. 2018. Electrochemical Biosensors with Electrocatalysts Based on Metallic Nanomaterials as Signal Labels. *Int. J. Electrochem. Sci*, 13, 10496-10513.
- Liu Y, He G, Liu H, Yin H, Gao F, Chen J, Yang B. 2020. Electrochemical immunosensor based on AuBP@Pt nanostructure and AuPd-PDA nanozyme for ultrasensitive detection of APOE4. *RSC Advances*, 10(13), 7912-7917.
- Liv L, Çoban G, Nakiboğlu N, Kocagöz T. 2021. A rapid, ultrasensitive voltammetric biosensor for determining SARS-CoV-2 spike protein in real samples. *Biosensors and Bioelectronics*, 192, 113497.
- Mahalakshmi S, Sridevi V. 2021. In situ electrodeposited gold nanoparticles on polyaniline-modified electrode surface for the detection of dopamine in presence of ascorbic acid and uric acid. *Electrocatalysis*, 12, 415-435.
- Mahari S, Roberts A, Shahdeo D, Gandhi S. 2020. eCovSens-Ultrasensitive Novel In-House Built Printed Circuit Board Based Electrochemical Device for Rapid Detection of nCovid-19 antigen, a spike protein domain 1 of SARS-CoV-2. *bioRxiv*.
- Mansournia M, Ghaderi L. 2017. CuO@ ZnO core-shell nanocomposites: novel hydrothermal synthesis and enhancement in photocatalytic property. *Journal of Alloys and Compounds*, 691, 171-177.
- Mohamed HM. 2016. Screen-printed disposable electrodes: Pharmaceutical applications and recent developments. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 82, 1-11.
- Mousavizadeh L, Ghasemi S. 2020. Genotype and phenotype of COVID-19: Their roles in pathogenesis. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*.

Nguyen H, Lee S, Lee U, Fermin C, Kim M. 2019. Immobilized enzymes in biosensor applications. *Materials*, 12(1), 121.

Ozel F, Kockar H. 2017. A Simple method of synthesis and characterizations of oleate-coated iron oxide nanoparticles. *Journal of Superconductivity and Novel Magnetism*, 30, 2023-2027.

Pan Y, Zhang D, Yang P, Poon LL, Wang Q. 2020. Viral load of SARS-CoV-2 in clinical samples. *The Lancet infectious diseases*, 20(4), 411-412.

Pastrian-Soto G. 2020. Bases Genéticas y Moleculares del COVID-19 (SARS-CoV-2). Mecanismos de Patogénesis y de Respuesta Inmune. *International journal of odontostomatology*, 14(3), 331-337.

Pérez-Campos Mayoral L, Hernández-Huerta MT, Mayoral-Andrade G, Pérez-Campos Mayoral E, Pérez-Campos E. 2020. A letter to the editor on “World Health Organization declares global emergency: A review of the 2019 novel Coronavirus (COVID-19).” *International Journal of Surgery*, 79(January), 163–164.

Rani P, Dalal R, Srivastava S. 2022. Study of electronic and optical properties of quantum dots. *Applied Nanoscience*, 12(7), 2127-2138.

Sadeghi SJ. 2013. Amperometric Biosensors. In: Roberts G.C.K. (eds) *Encyclopedia of Biophysics*. Springer, Berlin, Heidelberg.

Saenchoopa A, Klangphukhiew S, Somsu R, Talodthaisong C, Patramanon R, Daduang J, Kulchat S. 2021. A disposable electrochemical biosensor based on screen-printed carbon electrodes modified with silver nanowires/hpmc/chitosan/urease for the detection of mercury (ii) in water. *Biosensors*, 11(10), 351.

Sawai O, Oshima Y. 2008. Deposition of silver nanoparticles on activated carbon using supercritical water. *The Journal of Supercritical Fluids*, 47(2), 240-246.

Seo G, Lee G, Kim MJ, Baek SH, Choi M, Ku KB, Kim SJ. 2020. Rapid detection of COVID-19 causative virus (SARS-CoV-2) in human nasopharyngeal swab specimens using field-effect transistor-based biosensor. *ACS nano*, 14(4), 5135-5142.

- Tan YJ, Lim SG, Hong W. 2006. Understanding the accessory viral proteins unique to the severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus. *Antiviral research*, 72(2), 78-88.
- Torrente-Rodriguez RM, Lukas H, Tu J, Min J, Yang Y, Xu C. 2020. SARS-CoV-2 RapidPlex: A graphene-based multiplexed telemedicine platform for rapid and low-cost COVID-19 diagnosis and monitoring. 3 (6): 1981–1998.
- Vásquez V, Orozco J. 2023. Detection of COVID-19-related biomarkers by electrochemical biosensors and potential for diagnosis, prognosis, and prediction of the course of the disease in the context of personalized medicine. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 415(6), 1003-1031.
- Viet Long N, Ohtaki M, Yuasa M, Yoshida S, Kuragaki T, Minh Thi C, Nogami M. 2013. Synthesis and self-assembly of gold nanoparticles by chemically modified polyol methods under experimental control. *Journal of Nanomaterials*, 2013.
- Wahyuni HY, Misonia BSU, Santhy W, Shabarni G. 2018. A voltammetric immunosensor for detection of HER2 using gold modified-screen printed carbon electrode. *Res J Chem Environ*, 22, 294-301.
- Wang J, Liu N, Su Q, Lv Y, Yang C, Zhan H. 2022. Green Synthesis of Gold Nanoparticles and Study of Their Inhibitory Effect on Bulk Cancer Cells and Cancer Stem Cells in Breast Carcinoma. *Nanomaterials*, 12(19), 3324.
- Wei L, Tian N, Zhou ZY, Jiang YX, Sun SG. 2018. Electrocatalyst Preparation by Electrodeposition.
- Wu Q, Zhang Y, Yang Q, Yuan N, Zhang W. 2019. Review of Electrochemical DNA Biosensors for Detecting Food Borne Pathogens. *Sensors*, 19(22), 4916.
- Wu Z, Sun LP, Zhou Z, Li Q, Huo LH, Zhao H. 2018. Efficient nonenzymatic H₂O₂ biosensor based on ZIF-67 MOF derived Co nanoparticles embedded N-doped mesoporous carbon composites. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 276, 142-149.
- Xu H, Zhong L, Deng J, Peng J, Dan H, Zeng X, Chen Q. 2020. High expression of ACE2 receptor of 2019-nCoV on the epithelial cells of oral mucosa. *International journal of oral science*, 12(1), 1-5.

Yonker LM, Swank Z, Bartsch YC, Burns MD, Kane A, Boribong BP, Walt DR. 2023. Circulating Spike Protein Detected in Post-COVID-19 mRNA Vaccine Myocarditis. *Circulation*.

Zhang J, Liu Z, Han B, Li Z, Yang G, Li J, Chen J. 2006. Preparation of silica and TiO₂-SiO₂ core-shell nanoparticles in water-in-oil microemulsion using compressed CO₂ as reactant and antisolvent. *The Journal of supercritical fluids*, 36(3), 194-201.

Zhao F, Sun T, Geng F, Chen P, Gao Y. 2019. Metal-organic frameworks-based electrochemical sensors and biosensors. *Int. J. Electrochem. Sci*, 14, 5287-5304.

Zhao H, Liu F, Xie W, Zhou TC, OuYang J, Jin L, Zhang YP. 2020. Ultrasensitive supersandwich-type electrochemical sensor for SARS-CoV-2 from the infected COVID-19 patients using a smartphone. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 327, 128899.

Zhu Y, Wang H, Wang L, Zhu J, Jiang W. 2016. Cascade signal amplification based on copper nanoparticle-reported rolling circle amplification for ultrasensitive electrochemical detection of the prostate cancer biomarker. *ACS Applied Materials & Interfaces*, 8(4), 2573-2581.